

# **Arktisen kampamaneetin esiintyminen ja populaatioiden välinen geneettinen vaihtelu Itämerellä**

---

**Sanja Hakala  
Pro gradu –tutkielma  
Ekologia ja evoluutiobiologia  
Biotieteiden laitos  
Helsingin yliopisto  
Lokakuu 2012**

## Sisällysluettelo

1	Johdanto.....	3
1.1	Itämeri elinympäristönä.....	3
1.2	Mikä on kampamaneetti?.....	4
1.3	Itämeren kampamaneettitutkimuksen historia ja alueen lajisto.....	7
1.4	Arktinen kampamaneetti Arktiksella.....	9
1.5	Miksi populaatiogenetiikkaa?.....	10
1.6	Tutkimuskysymykset.....	13
2	Aineisto ja menetelmät.....	14
2.1	Näytteenotot.....	14
2.2	DNA:n eristys ja lajinmääritys.....	16
2.3	Ekologisen aineiston tilastollinen käsittely.....	19
2.4	AFLP.....	19
2.5	AFLP-aineiston analysointi.....	22
3	Tulokset.....	25
3.1	Lajien esiintyminen Itämerellä.....	25
3.2	Arktisen kampamaneetin esiintyminen eri syvyyksissä.....	28
3.3	Arktisen kampamaneetin koko Itämerellä.....	28
3.4	AFLP-tulokset.....	30
4	Tulosten tarkastelu.....	34
4.1	Amerikankampamaneetti ei ole levinnyt pohjoiselle Itämerelle.....	34
4.2	Pikkumaneetti Itämerellä?.....	35
4.3	Arktisen kampamaneetin yksilömäärät ja tiheys.....	36
4.4	Arktisen kampamaneetin esiintymissyvyys Itämeressä.....	38
4.5	Arktisen kampamaneetin pieni koko Itämeressä.....	40
4.6	AFLP:n soveltuvuus kampamaneeteille.....	41
4.7	Arktisen kampamaneetin populaatiogenetiikka Itämerellä.....	43
5	Loppuyhteenveto ja tulevaisuuden tutkimuskohteita.....	46
6	Kiitokset.....	47
7	Lähteet.....	48

# 1 Johdanto

Eliökuntamme on jaettu noin 35 pääjaksoon (Maddison & Schulz, 2007) (ITIS-organisaatio, 2009). Näistä vain tusinaa voi kutsua edes kutakuinkin hyvin tunnetuiksi (oma arvio julkaistun tutkimuksen määrän perusteella). Huonommin tunnetut pääjaksot ovat pääasiassa mereisiä selkärangattomia. Tässä opinnäytetyössä keskityn yhteen näistä huonosti tunnetuista pääjaksoista, kampamaneetteihin (Ctenophora). Vaikka ensimmäinen kampamaneetti, pikkumaneetti (*Pleurobrachia pileus* Müller) kuvattiin tieteelle jo vuonna 1776, kyseisistä eläimistä tiedetään edelleen hämmästyttävän vähän.

Suomen merialueilla vähäsuolaisessa Itämeressä kampamaneetit elävät levinneisyytensä äärirajoilla. Kampamaneetit ovat mereinen eliöryhmä (Dumont 1994), ja mainintoja murtovedessä elävistä lajeista on hyvin vähän. Esimerkiksi Floridan mangrovealueilta on kuitenkin raportoitu *Mnemiopsis*-suvun kampamaneetteja (Davis & Williams 1950) ja Itämerellä on kirjallisuuden mukaan elänyt pikkumaneettia (Levander 1901).

## 1.1 Itämeri elinympäristönä

Itämeri on yksi maailman suurimmista murtovesialtaista. Meren suolapitoisuus vaihtelee Tanskan rannikon 25 tilavuusprosentista Pohjanlahden ja Suomenlahden pohjukoiden kolmeen tilavuusprosenttiin (jatkossa ilmoitan suolapitoisuudet nykykäytännön mukaan ilman yksiköitä). Itämereen virtaa suurelta valuma-alueelta jokia pitkin makeaa vettä ja Tanskan salmien kautta tiheämpää suolaista merivettä. Tästä syystä vesipatsaassa on suolaisuuden harppauskerros 50–70 metrin syvyydessä, minkä alla suolaisuus on pintakerroksia korkeampaa. Kesäisin muodostuu lisäksi lämpötilan harppauskerros 10–30 metrin syvyyteen. Lämpötilan harppauskerroksen ylä- ja alapuoliset vedet sekoittuvat keväisin ja syksyisin, mutta suolaisuuden harppauskerros sekoittuu vain niinä harvoina kertoina, kun Tanskan salmista pääsee Itämereen kerralla suuri määrä suolaista merivettä. (Leppäkoski & Olenin 2000).

Ihmisen vaikutus Itämeren alueella on valtava, sillä meren valuma-alueella asuu 85 miljoonaa ihmistä (Leppäkoski ym. 2002). Viime vuosisadan aikana merialueen ekologia on muuttunut dramaattisesti ihmisen toiminnan seurauksena: Meren ravinteisuus on noussut. Eteläisellä Itämerellä huippupeto on vaihtunut ensin hylkeistä (*Halichoerus grypus* ja *Pusa hispida*) turskaan (*Gadus morhua*) ja myöhemmin taas silakkaan (*Clupea harengus membras*) (Alheit ym. 2005, Österblom ym. 2007). Nämä tekijät yhdessä alueen lämpötilan ja suolaisuuden suuren luontaisen vaihtelun ja

pienen alkuperäislajimäärän kanssa ovat tehneet Itämerestä hyvin epävakaa ekosysteemin, joka on herkkä myös vieraslajien leviämislle (Paavola ym. 2005).

Itämeri on geologisesti hyvin nuori, ja sen lajisto on siksi niukkaa – vain harvat lajit ovat ehtineet sopeutua alueen murtoveteen. Vähäsuolaisen pohjoisen Itämeren lajisto koostuu pääasiassa makean veden lajeista ja etelässä lajisto on mereisempää. Varsinaisia murtoveden lajeja on vähän (Furman ym. 1998). Nykyisin Itämeressä elää myös runsaasti ihmisen alueelle tuomia vieraslajeja, jotka uhkaavat useiden alkuperäislajien selviämistä alueella (Leppäkoski & Olenin 2000). Uusimpien tulokkaiden joukossa on amerikankampamaneetti *Mnemiopsis leidyi* Agassiz 1865 (Oliveira 2007). Tämän lajin leviäminen alueelle on tärkein syy sille, että Itämerellä tänä päivänä ylipäättään tutkitaan kampamaneetteja.

Merialueen dynamiikan tutkimiseksi ja varsinkin suojelupäätösten tueksi on ensiarvoisen tärkeää tunnistaa kaikki alueella elävät lajit sekä tuntea niiden elintavat. Lajin vaikutusta ympäröivään eliöyhteisöön on mahdotonta arvioida tuntematta sen ekologiaa tutkittavalla alueella. Tässä opinnäytetyössä pyrin paikkaamaan ilmeisimpiä aukkoja tietämyksessä Itämeren kampamaneettilajeista sekä ekologian että populaatiogenetiikan keinoin.

## 1.2 Mikä on kampamaneetti?

Kampamaneetit (Ctenophora) ovat hyytelömaisten, läpikuultavien eläinten muodostama pääjakso. Kampamaneetteja elää kaikissa mereisissä elinympäristöissä rannikoilta ulapalle ja merten syvänteisiin. Tästä huolimatta koko ryhmä on äärimmäisen huonosti tunnettu. Valtaosa lajeista on rakenteeltaan hauraita ja monet elävät hankalasti saavutettavissa elinympäristöissä (Harbison ym. 1978). Koska suurin osa lajeista tuhoutuu osittain tai täysin perinteisessä eläinplankton-näytteenotossa ja -säilönnässä, on niiden kvantitatiivinen tutkimus vaikeaa (Ackefors 1969, Hamner ym. 1975) eikä pitkäaikaisia seuranta-aineistoja ole kerätty. Tyypillisesti kampamaneetit puuttuvat eläinplanktonraporteista kokonaan, vaikka samalla alueella tälle pääjaksolle soveltuvien menetelmin tehdyissä kartoituksissa löytyy useita eri kampamaneettilajeja (Harbison ym. 1978).

Valtaosa kampamaneettitutkimuksesta on tehty meduusatutkimuksen yhteydessä, ja näistä ryhmistä käytetäänkin yhteistermiä *hyyytelöplankton*. Hyytelöplanktonia pidetään fysiologisesti muuta eläinplanktonia sopeutuvaisempana, ja näiden eläinten uskotaan yleistyvän tulevaisuudessa ympäristöolojen muuttuessa ihmisen toiminnan seurauksena (Richardson ym. 2009).

Hyytelöplanktonille luonnostaan tyypillisten massaesiintymien on väitetty jo lisääntyneen viime

vuosina ihmisen toiminnan seurauksena, mutta tällaisille väitteille ei viimeisimpien analyysien mukaan juuri ole todisteita (Condon ym. 2012).

Kampamaneetit luokiteltiin pitkään polttiaiseläinten (pääjakso Cnidaria) kanssa yhteiseen onteloeläinten pääjaksoon (Coelenterata) rakenteen ja elintapojen samankaltaisuuksien vuoksi. Sitten ne on siirretty omaksi pääjaksokseen, mutta ryhmiä pidettiin pitkään varsin läheisinä sukulaisina (Hyman 1940). Tästä ajatuksesta on pikkuhiljaa luovuttu, kun tieto ryhmien eroista morfologian (Eernisse ym. 1992) ja DNA:n suhteen on lisääntynyt (Collins 1998, Kim ym. 1999, Peterson & Eernisse 2001).

Kampamaneettien tarkka paikka eliökunnan sukupuussa on ollut kiistelyn kohteena jo vuosikymmeniä, eikä siitä vielä ole yksimielisyyttä. Tulokset ovat vaihdelleet sen mukaan, mitä aineistoa on analysoitu: Morfologisten analyysien perusteella kampamaneetit on sijoitettu lähemmäs kaksikytkisiä (Bilateria) (Schräm 1991, Zrzavy ym. 1998, Peterson & Eernisse 2001). Sen sijaan molekulaarisin menetelmin niiden pääteltiin eronneen muusta eliökunnasta jo varhaisessa vaiheessa, heti sienieläinten (Porifera) jälkeen (Collins 1998, Kim ym. 1999, Medina ym. 2001, Wallberg ym. 2004). Uusimpien tulosten mukaan kampamaneetit erosivat muiden eläinten kehityslinjasta jo ennen sienieläimiä, eli pääjakso muodostaisi sisäryhmän kaikille muille eläinryhmille (Dunn ym. 2008).

Kampamaneettilajeja on kuvattu noin 250, mutta osa tästä määrästä tiedetään päällekkäisiksi kuvauksiksi. Nykyfylogenioissa on käytössä noin 200 lajia, mutta näistä vain 100–150 arvellaan olevan todellisia, niin sanottuja hyviä lajeja. Tämän lisäksi tiedeyhteisö tuntee vähintään 25 lajia, joita ei kuitenkaan ole vielä virallisesti kuvattu (Mills, 1998). Esimerkiksi Raskoff ja muut (2010) raportoivat Alaskan pohjoispuolella Kanadan altaalla tehdyssä kartoituksessa kolme lajia, jotka he pystyivät määrittämään, kaksi lajia, jotka oli määritetty suvulleen ja lisäksi ainakin seitsemän määrittämätöntä, mahdollisesti tieteelle kuvaamatonta lajia, joista muutamalle lajille oli arvattu todennäköisin suku. Syvänmeren alueiden lajimäärästä ei ole kukaan esittänyt edes valistunutta arvausta. Yleinen käsitys on, että suuri määrä lajeja on kuvaamatta, ja että jo kuvatuissa lajeissa on useita virheitä (Mills, 1998, Podar ym. 2001). Yksi laji on voitu kuvata kahdeksi tai useammaksi eri lajiksi ja toisaalta kryptinen lajiryhmä on voitu kuvata yhdeksi ainoaksi lajiksi. Systematiikka perustuu tällä hetkellä lähes ainoastaan morfologisiin tuntomerkkeihin (Harbison 1985). MolekyyliSYSTEMAATTISIN menetelmin pääjaksoa on tutkittu vain muutama otteeseen hyvin pintapuolisesti (Podar ym. 2001).

Kampamaneetit ovat pienestä lajimäärästään huolimatta hyvin monimuotoinen pääjakso, jossa on kehittynyt mitä erilaisimpia elintapoja ja rakenteita (Harbison 1982). Kampamaneetit ovat muista eläimistä poiketen biradiaalisesti symmetrisiä<sup>1</sup> (Hyman 1940). Kaikilla lajeilla on ainakin jossakin kehityksensä vaiheessa kahdeksan yhteenliittyneistä värekarvoista muodostunutta kamparivistöä. Kampamaneetit ovat suurimpia värekarvojen avulla liikkuvia eläimiä – tosin jotkin lajit voivat käyttää liikkumiseen muitakin rakenteita, kuten liuskamaneetit (Lobata) pyyntiliuskojaan. Kaikki lajit pikkumaneettia ja muutamaa sen lähisukulaista lukuunottamatta ovat bioluminoivia, eli ne tuottavat valoa biokemiallisella prosessilla (Haddock & Case 1995). Kampamaneetit jaetaan kahteen luokkaan: suuremman lonkeromaneettien luokan (*Tentaculata*) lajeilla on ainakin jossakin kehityksensä vaiheessa kaksi pyyntilonkeroa, joissa on liimamaisen tahmeita kolloplasteiksi kutsuttuja soluja. Pienen myssymaneettien (*Nuda*) luokan jäsenillä ei ole pyyntilonkeroita, vaan ne tarttuvat saaliiseen lihaksikkailla huulillaan. Nämä ryhmät eivät kuitenkaan nykytietämyksen perusteella ole monofyleettisiä<sup>2</sup>, ja koko pääjakson taksonomia kaipaa kipeästi päivitystä (Harbison 1985, Podar ym. 2001).

Useimmat kampamaneettilajit ovat hermafrodiitteja ja pystyvät hedelmöittämään itsensä (Pianka 1974). Vain yhden suvun (*Ocyropsis*) lajeilla on erilliset sukupuolet. Joidenkin levymaneettien on raportoitu lisääntyvän suvuttomasti. Lähes kaikilla kampamaneeteilla on ulkoinen hedelmöitys ja vapaana vedessä keijuva muna. (Harbison & Miller 1986) Monilla lajeilla on useita elinkierron vaiheita, jotka voivat erota toisistaan huomattavasti sekä morfologialtaan että elintavoiltaan. Myös nuoret "toukkamuotoiset" yksilöt ovat useiden eri ryhmien lajeilla lisääntymiskykyisiä (pedogeneesi) (Hirota 1972). Muodonvaihdoksen aikana nuoruusmuodon sukurauhaset lakkaavat toimimasta ja aktivoituvat uudelleen aikuismuodossa (Martindale 1987). Jotkin tutkijat ovat sitä mieltä, että sanaa "toukka" ei tulisi käyttää kuvaamaan kampamaneettien nuoria muotoja, vaikka se on kirjallisuudessa yleistä (Martindale & Henry 1998). Myös Itämeren kampamaneettiyksilöitä on kuvattu toukiksi (esimerkiksi Jaspers ym. 2012 a), mutta tässä opinnäytetyössäni käytän termiä "pienet yksilöt".

Kaikki kampamaneettilajit ovat aktiivisia petoja (Matsumoto & Harbison 1993). Ne pystyvät käyttämään ruumiinpainoonsa nähden jopa tuhatkertaisen määrän ravintoa päivässä, ja niiden kasvu on hyvässä ravintotilanteessa nopeaa. Toisaalta huonossa ravintotilanteessa ne pystyvät käyttämään omia kudoksiaan energianlähteenä ja kutistumaan. (Reeve ym. 1978). Saalistustehokkuutensa ja

---

<sup>1</sup> Biradiaalisessa symmetriassa eläimen ruumiis rakentuu keskiakselin ympärille siten, että ruumiin vastakkaiset puolet ovat keskenään samanlaiset, mutta vierekkäiset eroavat toisistaan.

<sup>2</sup> Monofyleettisen eliöryhmän kaikki jäsenet ovat kehittyneet yhteisestä kantamuodosta ja kaikki tästä kantamuodosta kehittyneet eläimet kuuluvat ryhmään.

nopean kasvunsa vuoksi ne pystyvät säätelemään eläinplanktonpopulaatioiden kokoa ja toimimaan ekosysteemin avainlajeina (Greve & Reiners 1988). Kampamaneettien saalistuspotentialin on osoitettu olevan yhtä suuri kuin monien kalalajien (Acuña ym. 2011), mutta silti niiden aiheuttama saalistuspaine jää monissa ravintoverkkotutkimuksissa kokonaan huomiotta näytteenoton hankaluuden vuoksi (Hopcroft & Roff 1998).

### 1.3 Itämeren kampamaneettitutkimuksen historia ja alueen lajisto

Kun aloitin tätä opinnäytetyötäni, pohjoiselta Itämereltä oli raportoitu kolme kampamaneettilajia: pikkumaneetti, amerikankampamaneetti sekä arktinen kampamaneettilaji *Mertensia ovum* Fabricius 1780 (Gorokhova ym. 2009). Viimeksi mainitulla ei ole virallista suomenkielistä nimeä, joten viitataan siihen jatkossa arktisena kampamaneettina. Itämeren eteläosissa (Tanskan rannikolla ja Pohjanmeren suulla), missä suolapitoisuus on korkeampi, esiintyy lisäksi enemmän tai vähemmän satunnaisesti ainakin kolmea valtamerien kampamaneettilajia, *Bolinopsis infundibulum* Müller 1776, *Beroe cucumis* Fabricius 1780 ja *Beroe gracilis* Künne 1939 (Lenz 1973, Greve 1975).

Viime vuosisadalla pohjoisella Itämerellä kampamaneetteja ei ole tutkittu muutamia satunnaisia kartoituksia lukuun ottamatta. Näissä vanhoissa julkaisuissa vesillämme elävät kampamaneetit on määritetty pikkumaneetiksi. Vanhin maininta on 1900-luvun alusta (Levander 1901), minkä jälkeen lajin esiintymistä pohjoisella Itämerellä selvitettiin laajemmin 1950-luvulla (Lindquist 1958), ja muutamia lisäkartoituksia tehtiin 80-luvulla (Vuorinen 1987, Vuorinen & Vihersaari 1989). Näissä kartoituksissa pikkumaneetti mainitaan varsin yleiseksi. Eteläisemmällä Itämerellä (Götlanin allas, Gdansk in lahti, Bornholmin allas) lajia on tutkittu paremmin lähinnä viime vuosisadan alussa (Mielck 1926, Mielck & Künne 1935), ja muuten sitä on havaittu muun eläinplanktonnäytteenoton ohessa (esimerkiksi Ackefors 1969, Hernroth & Ackefors 1979). Tanskan ja Saksan rannikolla, erityisesti Kielinlahdella, on tehty enemmänkin pikkumaneettitutkimusta (esimerkiksi Krumbach 1926, Kändler 1961, Hillebrandt 1972). Pikkumaneetti on levinneisyydeltään lähestulkoon kosmopoliitti laji, jonka esiintymisestä on havaintoja aina Intian Valtamereltä Välimerelle ja Pohjanmerelle asti, ja Itämeren populaatiota on pidetty kummallisena kuriositeettina lajin levinneisyydessä (Mielck 1926, van der Veer & Sadee 1984). Monissa yhteyksissä mainitaan myös, että laji elää Itämeressä vain Pohjanmereltä virtaavan suolapitoisemman veden turvin – eli pohjoiselta Itämereltä raportoidut kampamaneettipopulaatiot jätetään näissä tutkimuksissa kokonaan huomiotta (esimerkiksi Niermann ym. 1998).

Itämeressä pikkumaneetin on raportoitu elävän vain yli 6,5:n suolapitoisuudessa (Vuorinen 1987) ja yli 40 metrin syvyydessä (Mielck & Künne 1935). Pohjanlahdella sen enimmäistiheydeksi on arvioitu suunnilleen kymmenen yksilöä kuutiometrissä (Vuorinen 1987), Suomenlahdella jopa hiukan suuremmaksi (Vuorinen & Vihersaari 1989). Etelämpänä (esimerkiksi Bornholmin altaalla) tiheydet jäävät huomattavasti pienemmiksi (Vuorinen & Vihersaari 1989). Tanskan ja Saksan rannikolla, jossa pikkumaneettia on tutkittu enemmän, tiheyksien on raportoitu nousevan ajoittain hyvinkin korkeiksi [esimerkiksi Kielinlahdella jopa 25 yksilöä kuutiossa (Hillebrandt, 1972)], ja ne vaihtelevat suuresti vuodenaikojen (Krumbach 1926, Kändler 1961) ja Pohjanmereltä tulevien virtausten (Sneider 1987) mukaan. Viimeiseen pariinkymmeneen ei ole julkaistu mitään kampamaneeteista Itämerellä. Pääjakson tutkimus alkoi uudelleen vasta amerikankampamaneetin levittyä alueelle.

Amerikankampamaneetti on pelätty vieraslaji, joka aiheutti laajaa tuhoa Mustallamerellä levittyään sinne 1980-luvulla. Se on sittemmin asettunut muillekin Euroopan merialueille (hyvä katsaus: Shiganova ym. 2001). Laji elää luontaisesti temperaattisissa ja subtrooppisissa lahdissa ja jokisuistoissa Pohjois- ja Etelä-Amerikan Atlantin puoleisella rannikolla (Mayer 1912). Ensimmäiset Itämerellä tehdyt havainnot saatiin alueen eteläosista vuonna 2005 (Oliveira 2007) ja sen havaittiin pian levinneen laajalle alueelle eteläiselle Itämerelle (Hansson 2006, Javidpour ym. 2006, Tendal ym. 2007). Etelä-Euroopan populaatiot näyttäisivät olevan peräisin eri alkuperäispopulaatiosta kuin Itämerellä elävät amerikankampamaneetit (Reusch ym. 2010). Molemmat levittäytymiset Eurooppaan ovat kuitenkin tapahtuneet samalla tavalla laivaliikenteen painolastivesien mukana (Oliveira 2007).

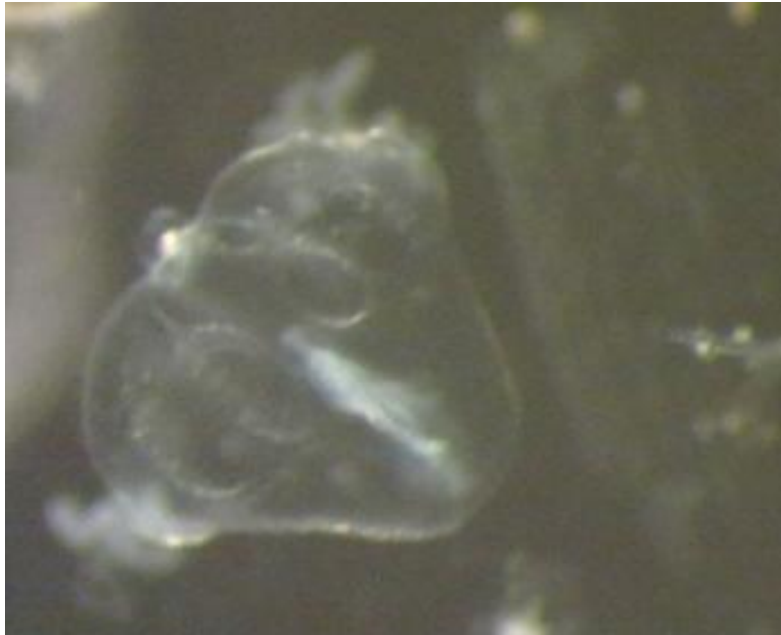
Amerikankampamaneetin raportoitiin levinneen myös Suomenlahdelle heti, kun kampamaneetteja alettiin jälleen kartoittaa alueella kesällä 2007 (Lehtiniemi ym. 2007). Kuitenkin syksyllä 2008 kerättiin Ahvenanmereltä näytteitä, joista määritettiin molekulaarisin menetelmin kolmas laji, arktinen kampamaneetti – laji, jota ei ole koskaan aiemmin löydetty murtovedestä (Gorokhova ym. 2009). Arktisen kampamaneetin löytyminen kyseenalaisti pohjoisen Itämeren aiemmat lajinmääritykset.

Nämä kolme kampamaneettilajia eroavat aikuismuodoissaan toisistaan selvästi, eikä suurten yksilöiden lajintunnistuksessa ole ongelmaa. Lajien pienissä yksilöissä ei kuitenkaan ole selviä lajituntomerkkejä (Gorokhova & Lehtiniemi 2010). Kuvassa 1 on mitä todennäköisimmin arktinen kampamaneetti, mutta lajintunnistus pelkän rakenteen perusteella on käytännössä mahdotonta. Sekä pikkumaneetti että arktinen kampamaneetti kuuluvat pallomaneettien (Cydippida) lahkoon, jonka



edustajilla on kaikissa kehitysvaiheissaan kaksi pyyntilonkeroa. Liuskamaneetteihin kuuluvan amerikankampamaneetin nuorilla vaiheilla on myös pyyntilonkerot, mutta ne surkastuvat yksilöiden kehittyessä. Pohjoisella Itämerellä kaikki tavatut kampamaneettiyksilöt ovat olleet vain muutamien millimetrin kokoisia ja pyyntilonkerollisia (Gorokhova ym. 2009). Eteläisellä Itämerellä amerikankampamaneettia ja pikkumaneettia esiintyy myös aikuismuodossaan, mutta arktista kampamaneettia on sielläkin löydetty vain pieninä yksilöinä (omat havainnot, Jaspers ym. 2012 a).

Itämerellä tehtyyn kampamaneettitutkimukseen on syytä suhtautua varauksella ainakin silloin, kun tutkimuksen lajistoa ei ole määritetty molekulaarisin menetelmin. Varsinkin lajinmääritykset ajalta, jolloin alueella ei ylipäätään tiedetty esiintyvän arktista kampamaneettia, ovat täysin epäluotettavia. Tässä opinnäytetyössä pyrin omalta osaltani selventämään alueen tilannetta.



KUVA 1: Keväällä 2009 Ahvenanmereltä pyydystetty noin kahden millimetrin mittainen pyyntilonkerollinen kampamaneettiyksilö, joka on selvinnyt näytteenotosta harvinaisen hyväkuntoisena. Tätä yksilöä ei ole määritetty lajilleen molekulaarisin menetelmin, eikä sen morfologisista tuntomerkeistä voi luotettavasti päätellä sen lajia. Samalta alueelta samaan aikaan kerätyt, molekulaarisesti lajilleen määritetyt yksilöt olivat kaikki arktisia kampamaneetteja (julkaisematon aineisto, Maiju Lehtiniemi).

#### **1.4 Arktinen kampamaneetti Arktiksella**

Arktinen kampamaneetti esiintyy kylmässä merivedessä kaikkialla pohjoisella pallonpuoliskolla (Mortensen 1912). Näillä arktisilla, usein jään peittämällä merialueilla se elää veden pintakerroksissa maksimissaan muutaman kymmenen metrin syvyydessä (Percy 1989, Raskoff ym. 2005, Purcell ym. 2010). Näissä syvyyksissä veden suolapitoisuus on yleensä hiukan alhaisempi

kuin valtamerten keskimääräinen suolapitoisuus, ja lämpötila pysyttelee nollan tuntumassa tai sen alle ympäri vuoden (Percy 1989, Raskoff ym. 2005).

Arktinen kampamaneetti elää jopa kolmevuotiaaksi, kasvaa enimmillään noin viisisenttiseksi ja talvehtii aikuisena (Percy 1989, Siferd & Conover 1992, Lundberg ym. 2006). Se lisääntyy koko kesän toukokuulta elokuulle, ja populaatio saavuttaa maksimikokonsa heinäkuussa (Lundberg ym. 2006). Sen lisääntyminen ajoittuu samaan ajankohtaan kuin hankajalkaisten lisääntyminen, jolloin pienille yksilöille on tarjolla reilusti pienikokoista saalista (Siferd & Conover 1992). Arktisen kampamaneetin tutkimus Arktiksella on keskittynyt aikuisiin yksilöihin, eikä pienten yksilöiden ekologiasta löydy juurikaan mainintoja.

Arktinen kampamaneetti on useilla elinalueillaan esiintymissyvyytensä runsaslukuisin planktinen peto (Percy & Fife 1981, Swanberg & Båmstedt 1991), ja vaikuttaa täten suuresti koko ravintoverkkoon. Aikuisena se käyttää ravinnokseen kaikkea eläinplanktonia, mutta keskittyy erityisesti suurempikokoisiin hankajalkaisäyriäisiin (Siferd & Conover 1992, Lundberg ym. 2006, Purcell ym. 2010). Arviot lajin aiheuttamasta saalistuspaineesta vaihtelevat yhdestä yhdeksään prosenttiin hankajalkaispopulaatioista päivässä, ja painetta on arvioitu vieläkin isommaksi kesäisin kampamaneettipopulaation ollessa suurimmillaan (Swanberg & Båmstedt 1991, Siferd & Conover 1992, Purcell ym. 2010). Arktiksella toinen kampamaneetti, *Beroe*-laji, on arktisen kampamaneetin pääsaalistaja (Falk-Petersen ym. 2002), ja sitä saalistaviksi pedoiksi on nimetty myös esimerkiksi seiti (*Boreogadus saida*), turska (*Gadus morhua*), myrskylintu (*Fulmarus glacialis*), pikkukajava (*Rissa tridactyla*) ja hiusmeduusa (*Cyanea capillata*) (Harrison 1984, Purcell 1991, Lundberg ym. 2006).

### 1.5 Miksi populaatiogenetiikkaa?

Matemaattisten mallien mukaan planktiset eläimet tai eläinten planktiset toukkamuodot leviävät passiivisesti merivirtojen mukana pitkiäkin matkoja (Roughgarden ym. 1985, Roberts 1997).

Merieläinten populaatioiden onkin tyypillisesti oletettu olevan suuria ja avoimia verrattuna makeanveden eläinten ja maaeläinten populaatioihin (Palumbi 1994, Ward ym. 1994).

Parinkymmenen viime vuoden aikana on kuitenkin löydetty yhä enemmän todisteita siitä, että mereisten lajien genomissa on enemmän vaihtelua kuin on oletettu (esimerkiksi Palumbi 1994, Benzie 1999, Barber ym. 2002). Laajalle levinneissä mereisissä lajeissa vaihtelua on jopa siinä määrin, että ennen yhtenä lajina pidetystä eläinryhmästä on löytynyt useita kryptisiä lajeja (hyvä kooste: Knowlton 2000). Esimerkiksi korvameduusasta (*Aurelia aurita*) on löytynyt vähintään

yhdeksän geneettisesti niin erilaista populaatiota, että on ehdotettu lajin pilkkomista niiden mukaan (Dawson & Jacobs 2001).

Mielestäni olisi hyvin mielenkiintoista tutkia arktisen kampamaneetin eri populaatioiden välistä geneettistä vaihtelua maailmanlaajuisesti. Lajin on raportoitu olevan laajalle levinnyt, ja eri alueiden populaatioiden ekologia tuntuu vaihtelevan melkoisesti, kuten tässäkin opinnäytetyössä tulee ilmi. Nämä samat väittämät pätevät moniin sittemmin kryptisiksi lajiryhmiksi osoittautuneisiin eläimiin (Knowlton 2000). Kun lisäksi otetaan huomioon, kuinka hankalaa kampamaneettien lajinmääritys pelkän rakenteen perusteella on, ja kuinka vähän niiden genomia on tutkittu, pidän mahdollisena, että arktinen kampamaneetti onkin todellisuudessa kryptisten lajien muodostama ryhmä.

Arktisen kampamaneetin genomia on tutkittu vain ribosomaalista RNA:ta koodaavien 18S- ja 5,8S-alueiden ja niiden välisten ITS-alueiden (internal transcribed spacer) osalta. Ne näyttävätkin olevan yhtenevät kaikilla tutkituilla, eri puolilta Arktista ja Itämerestä peräisin olevilla yksilöillä (Gorokhova ym. 2009). Se riittää kuitenkin vain todistamaan, että tutkitut yksilöt kuuluvat keskenään hyvin lähisukuiseen ryhmään. Se ei vielä riitä varmistamaan sitä, että kyseessä tosiaan on vain yksi ainoa laji eikä kryptinen lajiryhmä. Kampamaneettien kohdalla lajistatuksen selvittäminen pelkästään 18S-sekvenssin perusteella on mahdotonta, sillä se on epätavallisen yhtenevä kautta koko pääjakson (Podar ym. 2001). Esimerkiksi arktisen kampamaneetin ja toisen, tropiikissa elävän ja rakenteeltaan selvästi erilaisen *Mertensia*-lajin välillä on 18S-sekvenssissä vain kahden nukleotidin ero. ITS-alueilla eroa oli enemmän. (Podar ym. 2001). Lajistatusta määriteltäessä tulisi kuitenkin ehdottomasti tarkastella laajemmin koko genomia. Genomin eri alueiden vaihtelun määrässä on suuria eroja (Sachidanandam ym. 2001), minkä vuoksi yhden geenialueen perusteella ei voi vielä luotettavasti määrittää lajeja (Avice & Wollenberg 1997).

Vaikka arktinen kampamaneetti osoittautuisikin hyväksi lajiksi kautta koko pohjoiskalotin kattavan levinneisyytensä, olisi silti äärimmäisen mielenkiintoista tutkia lajin populaatioiden välistä geneettistä vaihtelua. Molekulaarisin menetelmin on esimerkiksi mahdollista selvittää, mistä ja milloin laji on saapunut Itämereen. Onko se vastikään saapunut tulokaslaji kuten esimerkiksi (Reusch ym. 2010) ovat ehdottaneet vai merellemme tyypillinen reliktilaji kuten Jaspers ja muut (2012 a) olettavat? Kysymykseen on helpointa vastata vertailemalla Itämeren ja Jäämeren populaatioiden välistä geneettistä vaihtelua (Avice 1989, Kliman ym. 2000). Tällä tavalla on vastikään tutkittu esimerkiksi amerikankampamaneetin invaasiohistoriaa (Reusch ym. 2010). Jos Itämeren populaatio on geneettisesti lähellä jotakin Arktista populaatiota, on oletettavaa että laji on

vastikään levinnyt tänne. Jos se on ollut täällä jo jääkaudesta lähtien, sillä on ollut reilusti aikaa sopeutua paikallisiin olosuhteisiin ja erilaistua, jolloin eri alueiden populaatioiden genomit eroavat toisistaan enemmän.

Itämeren sisällä kampamaneettipopulaatioiden geneettinen vaihtelu noudattanee IBD- teoriaa [Isolation By Distance, eriytyminen suhteessa välimatkaan (Wright 1943)], jonka mukaan neutraalien lokusten geneettinen erilaisuus kasvaa suhteessa maantieteellisen etäisyyteen. Sen on todettu pätevän myös merielinympäristössä (Hellberg ym. 1994), joskin maaelinympäristöjä suuremmassa mittakaavassa (Palumbi 1994). Vaikka mereisten eläinten levittäytymiskyky on monin verroin maalla eläviä eläimiä parempi, tapahtuu levittäytyminen kuitenkin todennäköisemmin lähelle kuin kauas, jolloin geenivirta heikkenee mitä pidemmästä välimatkasta on kyse (Palumbi 1994). Hypoteesini on, että kampamaneetit eivät muodosta Itämerellä geneettisesti yhtenäistä populaatiota, vaan geneettinen vaihtelu noudattaa IBD-teoriaa.

Kun viime vuosina kampamaneetteja on alettu tutkia myös molekyylibiologisin menetelmin, on havaittu, että joissakin perusmolekyylibiologisissa menetelmissä on tämän pääjakson kohdalla ongelmia. Esimerkiksi DNA:n saanto jää tuntemattomasta syystä pieneksi (Sanna Majaneva, julkaisematon aineisto, omat havainnot). Kampamaneettien mitokondrionaalisen DNA:n on todettu poikkeavan koko muusta eläinkunnasta sekä kooltaan että järjestykseltään (Pett ym. 2011, Kohn ym. 2012). Niiltä puuttuu useita muilla eläimillä olevia mitokondrionaalisia geenejä, ja jäljellä olevatkin geenialueet ovat järjestyneet muista eläimistä poikkeavalla tavalla (Pett ym. 2011, Kohn ym. 2012). Tästä syystä mitokondrionaaliseen DNA:han perustuvat molekulaariset menetelmät eivät ole tällä pääjaksolla toimineet.

AFLP [Amplified Fragment Length Polymorphism, vahvistettu DNA-pätkien pituuksien vaihtelu, (Vos ym. 1995)] on kasvikunnassa laajalti käytetty ja monipuoliseksi havaittu molekyylibiologinen menetelmä, jonka myös eläintieteilijät ovat viime vuosina ottaneet yhä laajemmin käyttöönsä (Bensch & Åkerson 2005). Opinnäytetyössäni selvitän tämän kampamaneeteille uuden molekulaarisen menetelmän soveltuvuutta arktisen kampamaneetin populaatiobiologiseen tutkimukseen. Työni toimii samalla pohjatyönä laajemmalle kokonaisuudelle, jossa selvitetään lajin geneettistä vaihtelua koko arktisen alueen mittakaavassa.

## 1.6 Tutkimuskysymykset

Tässä opinnäytetyössä selvitin, mitä kampamaneettilajeja pohjoisella Itämerellä elää. Hypoteesini oli julkaistun kirjallisuuden perusteella, että alueella elää kolmea kampamaneettilajia: pikkumaneettia, amerikankampamaneettia ja arktista kampamaneettia.

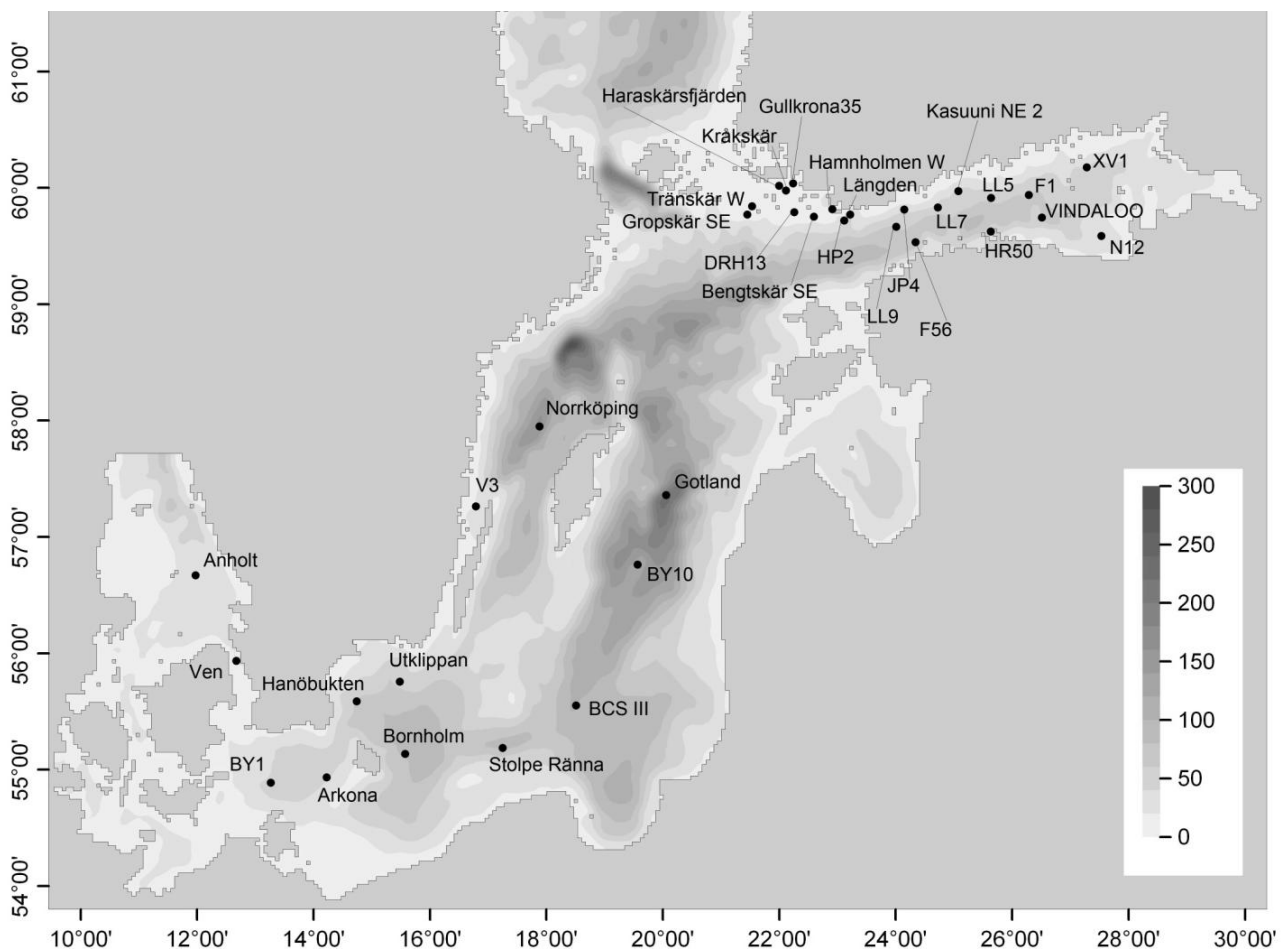
Työn edetessä kävi selväksi, että pohjoisella Itämerellä elää vain arktista kampamaneettia. Tällöin halusin selvittää, missä amerikankampamaneetin levinneisyyden raja Itämerellä todellisuudessa on. Hypoteesini oli, ettei amerikankampamaneetti ole levinnyt niin pohjoiseen kuin kirjallisuudessa oli raportoitu. Arvelin myös, että arktista kampamaneettia elää myös eteläisellä Itämerellä.

Lisäksi selvitin pilottikoehenkisesti AFLP–menetelmän soveltuvuutta kampamaneeteille. Tutkin tällä menetelmällä arktisen kampamaneetin populaatioiden geneettistä vaihtelua Itämeren eri alueiden välillä. Hypoteesini oli, että yksilöiden välinen geneettinen vaihtelu kasvaa etäisyyden kasvaessa.

## 2 Aineisto ja menetelmät

### 2.1 Näytteenotot

Keräsin kaksi näytesarjaa, toisen pohjoiselta ja toisen keskiseltä ja eteläiseltä Itämereltä (Kuva 2). Pohjoisen näytteenottoalue oli Suomenlahti. Tällä alueella on useita pitkäaikaisseurantojen näytteenottopisteitä, joilta kampamaneettinäytteet saatiin otettua tavallisten tutkimusmatkojen yhteydessä ilman muutoksia reitteihin ja aikatauluihin. Keskisen ja eteläisen Itämeren näytepisteet ovat osa vuonna 2009 aloitettua amerikankampamaneettiseurantaa. Näiltä pisteiltä sain hajanaisemman, mutta alueellisesti kattavan aineiston eteläisemmän Itämeren tilanteesta. Valtaosa näytepisteistäni on meren ulapalla ja yli 50 metriä syviä (yksityiskohtainen selvitys näytepisteistä Liitteessä 1). Sisällytin aineistooni vain muutaman matalan rannikkoaseman, sillä kampamaneettien on todettu esiintyvän Itämerellä vain syvällä (Mielck & Küne 1935).



Kuva 2. Näytepisteet syvyyskartan päällä esitettynä.

Näytteitä kerättiin loppukesällä kahdella tutkimusmatkalla Suomen aluevesillä, mta Muikulla (Suomen ympäristökeskus) 3.8. -14.8.2009 ja mta Arandalla (Suomen ympäristökeskus) 24.8.–3.9.2009 sekä syksyllä 12.10.–23.10.2009 yhdellä tutkimusmatkalla Ruotsin rannikkoa pitkin R/V Skagerrakilla (Göteborgin yliopisto). Ensin mainitulta näytteenottomatkalta sain näytteet Hanna Peltoselta, kahdelle muulle osallistuvin itse.

Aineisto kerättiin Suomenlahdella HYDRO-BIOS WP-2 -eläinplanktonhaavilla (silmäkkö 500 µm, suuaukon ala 0,25 m<sup>2</sup>), joka oli varustettu keräysastialalla (cod-end) ja sulkumekanismilla. Eteläisen Itämeren näytteet kerättiin sulkumekanismilla varustetulla keräysastiallisella HYDRO-BIOS MultiNet-eläinplanktonhaavilla (silmäkkö 300 µm, suuaukon ala 1 m<sup>2</sup>). Haavin veto aloitettiin Suomenlahdella 5 m pohjan yläpuolelta. Näin estetään pohjamudan joutuminen näytteeseen ja haavin tukkeutuminen. Etelä-Itämerellä varoetäisyyttä jätettiin enemmän. Veto tehtiin pystysuoraan pintaa kohti. Suomenlahdella vesipatsas jaettiin kahteen eri vetoon karkeasti lämpötilan harppauskerroksen mukaan. Kahdella syvemmällä näytteenottopisteellä (Gropskär SE ja LL7) vesipatsas jaettiin kolmeen osaan pinnasta lämpötilan harppauskerrokseen, suolaisuuden harppauskerrokseen ja siitä pohjaan. Eteläisellä Itämerellä vesipatsas jaettiin kahdesta viiteen kerrokseen niin, että pinnan kolme kerrosta olivat pääsääntöisesti kukin 10 m syviä, ja syvemmät kerrokset keskenään saman syvyiset.

Näytteiden kampamaneetit laskettiin ja mitattiin elävinä heti näytteenoton jälkeen stereomikroskoopilla. Kukin kampamaneettiyksilö mitattiin puolen millimetrin tarkkuudella. Niillä näytepisteillä, joilta kampamaneetteja tuli satoja, mitattiin satunnaisotos saaduista yksilöistä, kuitenkin vähintään viidesosa kaikista näytepisteen yksilöistä. Jokaiselta näytepisteeltä säilöttiin lajinnäytystä varten joko kaikki saadut yksilöt tai vähintään 20 yksilöä poimimalla ne yksittäin steriileihin 1,5 ml mikrosentrifugiputkiin (Suomenlahden näytteet, muutamat Etelä-Itämeren näytteistä) tai 96-kuoppalevyille (valtaosa Etelä-Itämeren näytteistä, joitakin Suomenlahden näytteistä). Näytteet kuivatettiin lämpökaapissa 60 °C lämpötilassa kunnes vesi oli kokonaan haihtunut, eli käytännössä yleensä yön yli. Tämän jälkeen näytteitä säilytettiin merellä jääkaapissa ja maihin saapumisen jälkeen kylmähuoneessa (~4 °C).

Estääkseni ristikontaminaation käytin kampamaneettien poimimiseen automaattipipettiä ja vaihdoin pipetinkärkeä eri näyteasemien välillä. AFLP-määrittelyyn valitsemillani näytepisteillä vaihdoin kärkeä muutaman yksilön välein. Pipetoin näytteenottojen yhteydessä myös negatiivisia kontroleja laboratoriotyöskentelyä varten. Kontrolliputkiin pipetoin pelkkää merivettä saman määrän kuin

näyteputkiin, ja käsittelin kontrolliputkia samoin kuin näytteitä. Hanna Peltonen käytti normaalia pipettiä kerätessään aineistoa rv Muikulla, eikä näiden näytteiden yhteydessä otettu kontrolleja.

Kultakin näytteenottopisteeltä kerättiin lisäksi tausta-aineistoa lämpötila-suolaisuusluotaimella (Conductivity-Temperature-Depth, CTD), jolla mitattiin lämpötila, suolaisuus ja happipitoisuus koko vesipatsaasta. Arandalla käytössä oli Sea-Bird Electronics 911plus CTD, Muikulla SeaBird Electronics 19 CTD ja Skagerrakilla Sea-bird Electronics 911 CTD.

## **2.2 DNA:n eristys ja lajinmääritys**

Eristin näytteideni DNA:ta kahdella eri menetelmällä. Molemmat perustuvat nukleiinihappojen sitoutumiseen kvartsikiteisiin denaturoivassa suolaliuoksessa. Kyseinen menetelmä on alun perin suunniteltu DNA-kappaleiden eristämiseen agarosigeeliltä (Voglestein & Gillespie 1979), ja sitä on sittemmin käytetty laajasti myrkyttömänä keinona DNA:n erottamiseen proteiineista, lipideistä ja muista epäpuhtauksista.

Eristin mikrosentrifugiputkiin säilöttyjen yksilöiden DNA:n Qiaqenin Blood and Tissue kit -eristyspakkauksella. Menetelmässä solut hajotetaan proteinaasiK:ta sisältävässä liuoksessa ja vapautuneet nukleiinihapot kiinnittyvät eristysputkien kvartsikalvon pintaan. DNA puhdistetaan huuhtelemalla kalvoa kahdella pesuliuoksella sentrifugin avulla. Lopuksi DNA liuotetaan laimealla suolaliuoksella. Noudatin eristyksessä valmistajan ohjeita (Qiagen 2006). Solujen hajotusvaiheessa näytteet olivat lämpöhauteella neljästä kuuteentoista tuntia (pääsääntöisesti yön yli). Lopuksi liuotin eristetyn DNA:n pakkauksen puskuriin ohjeesta poiketen vain yhteen kertaan 100 µl:lla mahdollisimman suuren pitoisuuden takaamiseksi.

Eristin 96-kuoppalevyille kerätyt näytteet Elphinstonen ja muiden (2003) mukaan. Menetelmä on periaatteeltaan sama kuin käyttämässäni kaupallisessa eristyspakkauksessa, mutta huomattavasti edullisempi. Kaupallisten kvartsikalvojen ja sentrifugin sijaan siinä käytetään kvartsikiteitä 96-kuoppaisella suodatuslevyllä sekä vakuumpumpulla aikaansaatua imua. Käytin samoja liuoksia kuin alkuperäisartikkelissa (Elphinstone ym. 2003). Säilytin kaikkia DNA-näytteitä -20 °C, lyhyempiä aikoja myös kylmähuoneessa +4 °C.

Määritin DNA-näytteistä yksilön lajin käyttäen hyväkseni PCR:ää (polymeraasiketjureaktio). Se on molekyylibiologian perusmenetelmä, jossa monistetaan suuri määrä haluttuja DNA-kappaleita koko genomin DNA:sta käyttäen kahta sekvenssikohtaista oligonukleotidialuketta ja DNA-polymeraasientsyymiä (Saiki ym. 1985) (Arnheim 1992).



Ribosomaalista RNA:ta koodaavia geenejä ja niiden väliin jääviä koodaamattomia alueita käytetään laajasti lajienvälisissä taksonomisissa tutkimuksissa. Alun perin menetelmä kehitettiin sienille (Gardes ym. 1991) mutta se otettiin pian käyttöön muidenkin eliöryhmien tutkimuksessa (Baldwin 1992), myös kampamaneettien (Podar ym. 2001). Tämä alue sisältää kolme kautta eliökunnan hyvin samanlaisina säilynyttä geeniä 18S, 5,8S ja 28S sekä niiden väliin jäävät koodaamattomat ja runsaasti muuntelevat alueet ITS1 ja ITS2. Lajinmäärityksen kannalta erityisesti nämä välialueet ovat käyttökelpoisia niiden suuren muuntelevuuden vuoksi (Gardes ym. 1991). Määritin näytteideni lajiston käyttäen apuna Gorokhovan ja muiden (2009) tälle DNA-alueelle suunnittelemaa lajikohtaisia PCR-alukkeita (Taulukko 1) Hylkäsin alukeparin PP1, sillä huomasin sen monistavan myös amerikankampamaneetin DNA:ta (Kuva 3).

Käytin 25 µl PCR-reaktioseoksessa 3 µl eristämäni DNA:ta laimentamattomana, 1,5 U Taq DNA-polymeraasia (Thermo Scientific), 1,5 µl kutakin 1mM deoksiribonukleotidia (Fermentas), 1,5 µl 25 mM magnesiumkloridia (Thermo Scientific) sekä alukkeita 10 pmol. Puskurina käytin Thermo Scientificin Reaction Buffer IV:tä. Käyttämäni PCR-ohjelma oli 95 °C 8 min, 30 x (95 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 15 s), 72 °C 7 min. Ajoin kaikki PCR-tuotteet SybrSafella värjätylle 1,5 % agarosigeelille, jolloin monistetut DNA-kappaleet saattoi kuvata UV-valossa.

Käytössäni oli kullekin lajille kaksi vaihtoehtoista alukeparia, joista käytin lajintunnistukseen lähtökohtaisesti vain jompaakumpaa. Jos sain agarosigeelille yksilöstä selkeän, halutun kokoisen juovan jonkin lajin alukeparilla, oletin yksilön olevan kyseistä lajia. Varmistin määrityksen toisella alukeparilla, jos geelille saamani DNA-juova ei ollut tarpeeksi kirkas ensimmäisessä määrityksessä. Ajoin noin puolet näytteistä kaikkien kolmen lajin alukkeilla, loput vain yhden lajin alukkeilla.

Jaoin aineistoni neljään eri lajiluokkaan PCR-tulosten perusteella: amerikankampamaneetti, arktinen kampamaneetti, pikkumaneetti ja "epävarmat". Ajoin PCR:ää myös näytteenottojen yhteydessä pipetoimistani negatiivisista kontrolleista käyttäen näytepisteellä esiintyvän lajin alukkeita ja ajoin tuotteet agarosigeelille näytteiden tavoin. Osa kontrolleista antoi hyvin heikon juovan agarosigeelille, joten tulkitsin myös varsinaisissa näytteissäni hyvin heikon juovan aina kontaminaatioksi ja luokittelin sellaisen antavat näyteyksilöt "epävarmoiksi". Samaa luokkaa käytin, jos en saanut näytteestä lainkaan PCR-tuotetta. Toistin epäonnistuneet PCR-reaktiot, ja vasta kaksi epäonnistunutta reaktiota sijoitti yksilön "epävarmoihin". Jos sain näytteestä jonkin lajin alukkeella vahvan raidan ja toisen lajin alukkeella hyvin heikon, oletin yksilön olevan vahvan raidan osoittamaa lajia, ja heikon PCR-tuotteen merkitsevän vain kontaminaatiota. Tällaisia yksilöitä oli vain muutama, ja vain niiltä asemilta, joilla muutenkin havaittiin kahta lajia. Jos sain

PCR-reaktiossa yhtä vahvat raidat kahden eri lajin alukkeilla, sijoitin yksilön luokkaan "epävarmat". Tällaisia yksilöitä oli vain kaksi.

Ne pisteet, joilta havaittiin vain yhtä lajia, käsittelin analyysissäni ja kuvaajissani niin, että harvat epävarmatkin yksilöt oletettiin tuon yhden löydetyn lajin yksilöiksi. Niillä Etelä-Itämeren pisteillä, joilta löytyi tutkimusmatkamme aikana kahta eri lajia joko omissa näytteissäni tai tutkimusmatkalla kerätyissä muissa näytteissä, pidin epävarmat yksilöt omana luokkana.

Taulukko 1. Lajinmäärityksessä käytetyt alukeparit (Gorokhova ym. 2009) kiinnittymiskohtineen ja kohdealueineen. Kursivoidut alukkeet hylkäsin epäspesifeinä (Kuva 3).

Aluke	Sekvenssi (5' → 3')	Kiinnittymiskohta	Kohdealue
M1F	CGCCGAAAACCTTGCTCAAAC	18S rRNA:n 3' -pää	ITS1
M1R	CCGAGCGACAGATCGGATAC	ITS1	
M2F	GTGCTGATTACGTCCCTGCC	18S rRNA:n 3' -pää	ITS1
M2R	CCCACGGACGATTTAACGAA	ITS1	
PP1F	CGTAGGTGAACCTGCGGAAG	18S rRNA:n 3' -pää	ITS1 + 5.8S rRNA
PP1R	GCTCGGGGATCGCTCTACTT	ITS2	
PP2F	AGACTTCATCGTGCTGGGGA	18S rRNA	18S rRNA + ITS1
PP2R	GTTAGGCCAACCCGAAGAC	ITS1	
ML1F	TCGATGAAGAACGCAGCAAA	ITS1	ITS1 + 5.8S rRNA
ML1R	GAACCCTTTCCAGTCGTCCC	ITS2	
ML2F	TAGGTGAACCTGCGGAAGGA	18S rRNA:n 3' -pää	ITS1 + 5.8S rRNA
ML2R	CTTCGGACATCCTGCAAAGC	ITS2	



Kuva 3. Käytettyjen alukkeiden monistamat DNA-pätkät ajettuna SybrSafella värjätylle geelille ja kuvattuna UV-valossa. Molekyyliainostandardiluoksena Fermentas GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Alukkeet järjestyksessä: näytteitäni vain heikosti monistavat universaalialukkeet 18S (Podar ym. 2001) ja UNI7F + UNI1534R (Moon-van der Staay ym. 2001), M1, M2, PP1, PP2, ML1, ML2 (Gorokhova ym. 2009).

### 2.3 Ekologisen aineiston tilastollinen käsittely

Laskin kunkin näytepisteen ja kunkin näytteenotto-syvyyden kampamaneettimäärät neliö- ja kuutiometriä kohden sekä piirsin aineistoa havainnollistavat kuvat ja taulukot Microsoft Excel – taulukkolaskentaohjelmalla. Piirsin CTD-aineistostani ja kampamaneettien tiheyksistä kuvat SigmaPlot 10.0:lla.

Analysoin kampamaneettien esiintymistä HLM 7 opiskelijaversiolla (Scientific Software International), joka soveltuu hierarkkisen datan käsittelyyn. Muunsin aineiston ohjelman ymmärtämään kaksitasoiseen muotoon PASW:lla. Käytin laajennettua Poissonin regressiomallia "overdispersed poisson model with variable exposure" analysoidakseni arktisen kampamaneetin esiintymiseen vaikuttavia tekijöitä eri näytepisteillä ja eri syvyyksissä. Laskin analyysia varten CTD-aineistosta kutakin haavin vetoa vastaavan vesipatsaan lämpötilan, suolaisuuden ja happipitoisuuden keskiarvot, ja analysoin näiden vaikutusta haavinvedon tilavuuteen suhteutettuun maneettimäärään niin, että otin huomioon myös leveyspiirin vaikutuksen (malliyhtälöt Liitteessä 2).

Vertailin pohjoisen ja etelän näytepisteiltä saatujen kampamaneettien kokoeroja järjestyslukuihin perustuvalla Wilcoxonin testillä käyttäen tilasto-ohjelmaa PASW Statistics 17 (Predictive Analytics SoftWare - SPSS Inc). Kyseinen testi sopii hyvin keskiarvojen vertailuun tämällytyypisellä aineistolla, jonka näytteitä ei voi pitää toisistaan riippumattomina.

### 2.4 AFLP

Valitsin arktisen kampamaneetin geneettisen muuntelevuuden tutkimusmetodiksi AFLP:n (Vos ym. 1995). Koska menetelmä ei vaadi pohjatietoa tutkittavan organismin genomista, se soveltuu hyvin tälle pääjaksolle. Se on myös edullinen, nopea ja suoraviivainen menetelmä, eikä se vaadi erityisempiä esityövaiheita tai lajispesifisten alukkeiden suunnittelua, kuten esimerkiksi mikrosatelliitit (Lowe ym. 2004). AFLP-menetelmän erottelukyky on monia muita menetelmiä parempi, koska se perustuu koko genomien pilkkomiseen ja tuottaa runsaasti polymorfista geneettistä aineistoa (Bensch & Åkerson 2005). Menetelmän suurin heikkous on, ettei se erottele homo- ja heterotsygootteja. AFLP pilkkoo kaiken näytteessä olevan DNA:n, minkä vuoksi näytteissä ei saisi olla kontaminantti-DNA:ta. Tämä tekee menetelmästä haastavan kampamaneettien kaltaisilla lajeilla, joita ei voi viljellä.

AFLP:ssä eliön koko genomi pilkkotaan kappaleiksi usein pilkkovalla ja harvemmin pilkkovalla restriktioentsyymillä. Tällä tavoin saatujen DNA-kappaleiden yksijuosteisiin päihin kiinnitetään

ligaatiossa kaksijuosteiset adapterit, jotka ovat keinotekoisesti rakennettuja lyhyitä DNA-kappaleita. Seuraavien vaiheiden PCR-alukkeet on suunniteltu tarttumaan näihin adaptereihin. AFLP:ssä hyödynnetään kaksivaiheista PCR-reaktiota. Ensimmäisessä (pre-selektiivisessä) PCR-reaktiossa DNA-kappaleita monistetaan adaptorien kanssa yhtenevillä alukkeilla, joihin on usein liitetty yksi emäs. Tässä ensimmäisessä PCR-reaktiossa monistuu laskennallisesti  $1/16$  ( $1/4 \times 1/4$ ) olemassa olevista DNA-kappaleista. Toisessa valikoivammassa (selektiivisessä) PCR-reaktiossa ensimmäisen PCR-reaktion tuotteet monistetaan alukkeilla, joihin on lisätty yhdestä kolmeen valikoivaa emästä sekä 5'-pään-alukkeeseen fluoresoiva leima. Nämä leimatut ja monistetut DNA-kappaleet (niin sanotut AFLP-fragmentit) erotellaan koon mukaan polyakryyliamidigeelillä tai automaattisella sekvensaattorilla. Yhdistelemällä erilaisia valikoivia alukkeita saadaan niin sanottuja geneettisiä sormenjälkiä (Lowe ym. 2004), joita voidaan hyödyntää geneettisissä tutkimuksissa. (Vos ym. 1995).

Valitsin AFLP:hen kaksi näytepistettä Suomenlahdelta (LL7 ja Tränskär W) ja kaksi Etelä-Itämereltä (Stolppe ja BCS). Kultakin näytepisteeltä valitsin AFLP:hen kymmenen satunnaista näyteyksilöä. Jokaisen yksilön DNA-näytteestä tein kaksi rinnakkaisnäytettä.

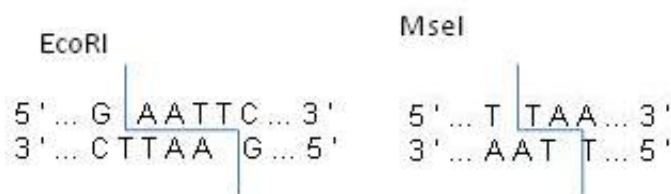
Tutkimuksessa käytin alkuperäisestä menetelmästä (Vos ym. 1995) mukailtua menetelmää. Digestiossa inkuboin DNA-näytteitä  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  lämpötilassa tunnin ajan. Koska näytteet olivat laimeita, käytin kustakin maksimimäärän DNA:ta, eli  $8,3\text{ }\mu\text{l}$  /  $10\text{ }\mu\text{l}$ . Tällöin lopullisen reaktioseoksen DNA-kokonaispitoisuus vaihteli välillä  $31\text{--}182\text{ ng}$  ( $3\text{--}18\text{ ng}/\mu\text{l}$ ). Reaktioseoksessa oli lisäksi  $1,4\text{ U}$  EcoRI- ja  $1,3\text{ U}$  MseI-restriktioentsyymejä (molemmat New England BioLabs) (Kuva 4),  $0,5\text{ }\mu\text{g}$  BSA:ta (New England BioLabs) ja NEBuffer 4-puskuria (New England BioLabs).

Seuraavassa vaiheessa, ligaatiossa, lisäsin kuhunkin näytteeseen  $2,5\text{ }\mu\text{l}$  reaktioseosta, jossa oli  $20\text{ U}$  T4 DNA-ligaasia,  $0,0125\text{ }\mu\text{l}$  E-adaptereja,  $0,125\text{ }\mu\text{l}$  M-adaptereja (Oligomer,  $100\text{ }\mu\text{M}$ ) (Taulukko 2) sekä T4 DNA-ligaasin puskuria (New England BioLabs). Inkuboin näytteitä  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa kolme tuntia. Tämän ajan sekä ensimmäisen vaiheen restriktioentsyymit että toisen vaiheen ligaasi ovat aktiivisia. Lopulta siirsin näytteet 15 minuutiksi  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ :een entsyymien aktiivisuuden päättämiseksi. Laimensin näytteitä 1:2.

Esimonistava PCR-reaktioseos sisälsi  $5\text{ }\mu\text{l}$  laimennettua ligaatiotuotetta,  $0,5\text{ U}$  Taq DNA-polymeraasia (Thermo Scientific),  $200\text{ }\mu\text{M}$  kutakin deoksiribonukleotidia (Fermentas),  $2,5\text{ mM}$  magnesiumkloridia (Thermo Scientific) sekä E- ja M-alukkeita (Oligomer) (Taulukko 3) kumpaakin  $3\text{ pmol}$  sekä Thermo Scientificin Reaction Buffer IV-puskuria. Ajoin näytteet PCR-ohjelmalla: 94

°C 2 min, 20 x (94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min), 72 °C 10 min, jonka jälkeen laimensin PCR-tuotteet 1:10.

Valikoivan PCR:n tein kuudella eri alukeyhdistelmällä. PCR-reaktioseos sisälsi 2,5 µl laimennettua esimonistavan PCR:n tuotetta, 0.5 U Taq DNA-polymeraasia (Thermo Scientific), 200 µM kutakin deoksiribonukleotidia (Fermentas), 2,5 mM magnesiumkloridia (Thermo Scientific) sekä E- ja M-alukkeita (Oligomer) (Taulukko 4) kumpaakin 6 pmol sekä Thermo Scientificin Reaction Buffer IV-puskuria. Selektiivisen monistuksen PCR-ohjelma oli 94 °C 2min, 12 x (94 °C 30 s, 65 °C -0,7 °C/ kierros 30 s, 72 °C 1 min), 23 x (94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min), 72 °C 10 min. Kyseessä on niin sanottu "touchdown-PCR", jossa alukkeiden liittymisvaiheen lämpötila on ensimmäisten syklien ajan optimaalista korkeampi, ja sitä lasketaan sykli sykliltä kunnes saavutetaan optimaalinen liittymislämpötila. Näin vähennetään alukkeiden epätarkkaa kiinnittymistä DNA-juosteeseen. (Korbie & Mattick 2008). Näytteet analysoitiin Biotekniikan instituutissa ABI 3730XL (Applied Biosystems) sekvensaattorilla.



Kuva 4. Restriktioentsyymien tunnistuskohtien sekvenssit ja leikkauskohdat.

Taulukko 2. Ligaatiossa käytettyjen adaptoreiden sekvenssit

E-adaptorit (EcoRI)	M-adaptorit (MseI)
5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'	5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'
5'-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3'	5'-TAC TCA GGA °CTC AT-3'

Taulukko 3. Esimonistavan PCR:n alukkeet

E-alue	M-alue
lisättyä emäksenä T	lisättyä emäksenä C
5'-GAC TGC GTA CCA ATT CT-3'	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3'

Taulukko 4. Valikoivan PCR:n alukeyhdistelmät ja leimat

Yhdistelmä	<i>Eco RI</i> -aluke FAM-leimalla	<i>Mse I</i> -aluke
1	<i>Eco RI</i> aluke + TA	<i>Mse I</i> aluke + CC
2	<i>Eco RI</i> aluke + TC	<i>Mse I</i> aluke + CG
3	<i>Eco RI</i> aluke + TG	<i>Mse I</i> aluke + CA
4	<i>Eco RI</i> aluke + AAG	<i>Mse I</i> aluke + CTA
5	<i>Eco RI</i> aluke + AAG	<i>Mse I</i> aluke + CGC
6	<i>Eco RI</i> aluke + TG	<i>Mse I</i> aluke + CGA

*Eco RI* -alukkeen sekvenssi on 5'-GAC TGC GTA CCA ATT C+ XX (X)-3' ja

*Mse I* -alukkeen sekvenssi 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A+ XX (X)-3'.

## 2.5 AFLP-aineiston analysointi

Käsittelin AFLP-kappaleaineiston Genemapper 4.0 (Applied Biosystems) –ohjelmalla. Määrittelin AFLP-kappaleet signaalien intensiteettiärvon (RFU) mukaan raja-arvolla 250 RFU. Otin mukaan analyysihin vain 150–500 emäsparin mittaiset kappaleet ja määritin alleelin tarkkuushaarukan (bin size) 1,5:ksi. Loin näillä säädöillä jokaiselle alukeparille oman paneelinsa näytteiden pohjalta ja määritin varsinaiset alleelit luotua paneelia vasten vertaamalla näytteiden fragmentteja paneeliin alleelien määrittämisrajalla (allele calling limit) 50. Normalisoin näytteet jokainen alukepari erikseen käyttämällä normalisointimenetelmänä ajon signaalien summaa (normalization scope: within run, normalization method: sum of signal). Tämän jälkeen käänsin normalisoidun aineiston RFU-arvot binaarisiksi 0/1-matriisiksi Microsoft Office Excel-ohjelmalla raja-arvolla 250 RFU. Tätä heikommat arvot saivat arvon 0 ja vahvemmat arvon 1. Poistin aineistosta näytteet, joissa arvoa 1 oli alle kolmen alleelin verran tai ei ollenkaan. Laskin kullekin alukeparille keskimääräiset virheprosentit (kunkin replikaattinäyteparin toisistaan eroavien lokusten määrä prosentteina koko lokusmäärästä) menetelmän toistettavuuden arvioimiseksi. Laskin myös alleelien yleisyydet (kaikkien lokusten esiintyvien alleelien yleisyysprosenttien keskiarvo) sekä näytepisteittäin että alukkeittain. Laskin aineiston kullekin näytepisteelle geneettisen diversiteetin (Nei 1987) ja polymorfisten lokusten osuuden AFLPdat-komentosarjalla (Ehrich 2006) tilasto-ohjelmassa R 2.12.2 (RDevelopmentCoreTeam, 2011).

Tein AFLP-kappaleiden normalisoinnin ja muuttamisen binaarimatriisiksi vertailun vuoksi myös AFLPScore-ohjelmassa (Whitlock ym. 2008), jossa aineistolle laskettiin myös rinnakkaisnäytteiden virheprosentit (mismatch error rates) alukepareittain. AFLPscoressa AFLP-kappaleiden linjaus ei

onnistunut yhtä hyvin kuin Genemapperilla ja saatu matriisi osoittautui Excel-pisteytystä epäluotettavammaksi. Tästä syystä valitsin Excel-pisteytetyn matriisin jatkoanalyysiin.

Analysoin pisteytetyn aineiston Structure 2.3.3.-ohjelmassa. Ohjelman laskennallinen malli perustuu oletukseen, että osapopulaatiot voidaan erottaa toisistaan genotyyppifrekvenssien perusteella. Structure sijoittaa genotyyppejä jokaiseen ennalta määritettyyn hypoteettiseen populaatiolukumäärään, joista se valitsee todennäköisimmän määrän populaatioita, joihin näyteaineiston genotyypit soveltuvat. Structure hyödyntää Markov Monte Carlo (MCMC) simulaatiota ja bayesilaiseen logiikkaan pohjaavia malleja, joilla jaetaan yksilöt geneettisen samankaltaisuuden perusteella erillisiin populaatioihin, joiden määrä on  $K$  (Pritchard ym. 2000).

Analysoin AFLP-aineiston Structuressa seuraavilla asetuksilla: 50 000 MCMC-jaksoa  $\times$  50 000 MCMC-jaksoa ja 20 itsenäistä replikaattijakoa, joissa alleelifrekvenssien annettiin korreloida. Koska kyseessä on sama maantieteellinen alue, oletin, että yksilöillä on geenivirtaa (admixture-malli). Hypoteettisia populaatioita, joihin ohjelma testasi genotyyppejä, oli mukana yhdestä kuuteen ( $K=1-6$ ).

Arvioin Structure -tulokset Structure Harvester -ohjelmalla Evannon ja muiden (2005) kriteerien mukaan. Structure laskee jokaisen mallinnetun  $K$ :n arvon jokaiselle iteraatiolle (laskusykliä, toistolle) posteriorin todennäköisyysjakauman ennusteen  $\Pr(X|K)$  (Pritchard ym. 2000), ja näiden bayesilaisten todennäköisyyksien pohjalta jokaiselle  $K$ :lle keskimääräisen logaritmisien uskottavuuden  $L(K)$ . Populaatorakennetta voi visualisoida esittämällä  $L(K)$   $K$ :n suhteen. Todennäköisimpänä populaatioiden lukumääränä on yleensä pidetty sitä  $L(K)$ -arvoa, jossa logaritmisien uskottavuuksien muodostama käyrä tasoittuu ja vaihtelu alkaa kasvaa (Pritchard ym. 2000).  $\Delta K$ -arvon on kuitenkin havaittu olevan tätä luotettavampi populaatorakenteen kuvaaja (Evanno ym. 2005).  $\Delta K$  on nimenomaan populaatorakenteen kuvaamista varten kehitetty suure, joka perustuu  $K$ :n logaritmisien todennäköisyyden toisen asteen muutosnopeuteen. Populaatorakenne on nähtävissä esittämällä  $\Delta K$   $K$ :n suhteen, jolloin todennäköisin populaatioiden määrä on se  $K$ :n arvo, jolla  $\Delta K$  on korkein (Evanno ym. 2005). Piirsin  $L(K)$  ja  $\Delta K$  -kuvaajat käyttäen verkko-ohjelmistoa Structure Harvester 0.6.8 (Earl e vonHoldt, 2011).

Jaoin pisteytetyn aineiston Structuren antamien tulosten sekä näytteiden alkuperän mukaisiin populaatioihin ja testasin niiden geneettistä erilaistumista ja sen merkittävyyttä Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010) -ohjelmalla. Mittasin geneettistä erilaistumista laskemalla populaatioiden väliset parittaiset  $F_{st}$ -arvot ja arvioin luotettavuutta testaamalla  $p$ -arvoa 10 000

permutaation kautta. Pidin tuloksia tarpeeksi merkittävinä kun  $p < 0.01$ . Lisäksi testasin Arlequinissa geneettisen erilaistumisen ja maantieteellisen etäisyyden korrelaatiota Mantel-testin avulla.

Testasin geneettisen vaihtelevuuden jakautumista jakamalla geneettisen diversiteetin ryhmän sisäisiin ja välisiin varianssikomponentteihin ja testaamalla kuinka genotyyppien varianssi on jakautunut näiden kesken käyttämällä AMOVA-varianssianalyysia (analysis of molecular variance), jossa arvioin varianssikomponenttien merkitsevyyttä 10 000 permutaatiolla.

Laskin aineistolle parittaiset geneettiset etäisyydet (Nei & Li 1979) Treecon-ohjelmassa (Van de Peer & De Wachter 1994) ja tein niiden perusteella, UPGMA-puun (yksinkertainen etäisyyksiin perustuva ryhmittely, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sokal & Michener 1958). Arvioin puun luotettavuutta 2000 toiston bootstrap-analyysillä, joka testaa, kuinka suuri prosenttiosuus varsinaisesta aineistosta poimituista testiaineistoista antaa saman tuloksen kuin varsinainen aineisto (Efron 1979).

.



### 3 Tulokset

#### 3.1 Lajien esiintyminen Itämerellä

Aineistoni koostuu yhteensä 4168 kampamaneettiyksilöstä, joista 1990 on Suomenlahdella ja 2178 eteläiseltä Itämereltä (Liite 1). Runsaslukuisin ja koko alueella yleinen kampamaneettilaji oli arktinen kampamaneetti. Suomenlahdella se oli aineistoni ainoa laji, ja eteläisellä Itämerelläkin vallitseva laji aivan läntisimpiä osia lukuun ottamatta. Pelättyä vieraslajia amerikankampamaneettia esiintyi vain viidellä asemalla Bornholmista länteen. Bornholmin syvänteiden alueella oli vain yksittäisiä yksilöitä. Amerikankampamaneetti oli vallitseva laji vain Tanskan saaristossa (kahden aseman keskiarvo 29 yksilöä/m<sup>2</sup>) ja Ruotsin länsirannikolla (asemalla Anholt 188 yksilöä/m<sup>2</sup>). Aineistoni mukaan Itämeren kampamaneettilajien levinneisyydet (Kuva 5) poikkeavat suuresti ennen opinnäytetyötäni raportoiduista levinneisyyksistä.

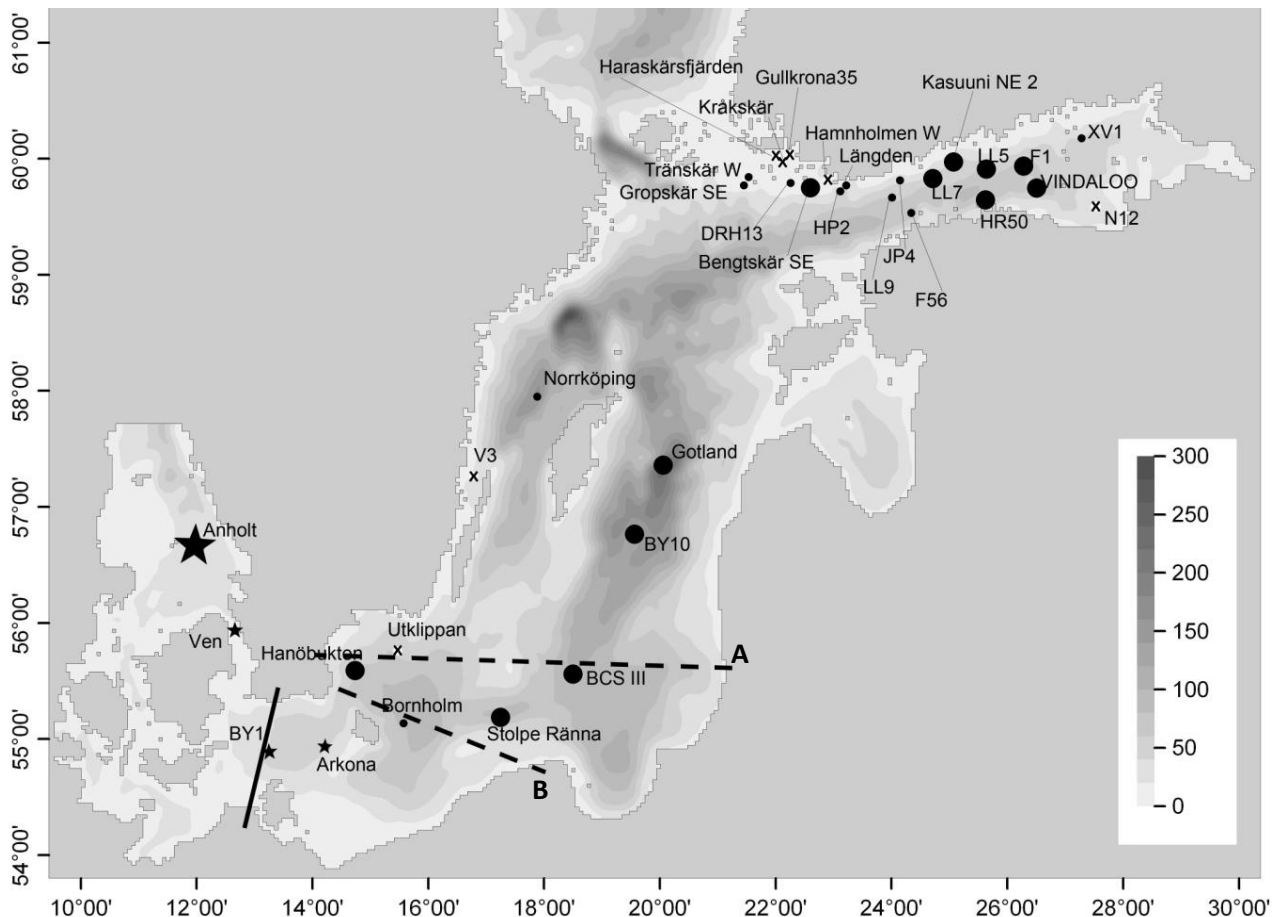
Vanhastaan Itämeren lajina pidettyä pikkumaneettia ei näytteissäni esiintynyt lainkaan varsinaisen Itämeren puolella. Ainoat aineistooni osuneet yksilöt olivat Pohjanmeren puolelta Anholt-asemalta saamani kaksi aikuista yksilöä. Yksikään pieni yksilö ei ollut tätä lajia.

Suurin havaitsemani arktisen kampamaneetin esiintymä oli asemalla LL7 keskellä Suomenlahtea, jossa arktisia kampamaneetteja oli 3956 yksilöä/m<sup>2</sup>. Kyseisellä asemalla vesipatsas jaettiin kolmeen eri haavinvetoon, ja syvimmissä osuudessa kampamaneettitiheys ylsi yli kuuteenkymmeneen yksilöön kuutiometrillä. Vastaavasti eteläisemmän Itämeren suurimmat yksilömäärät saatiin Gotlannin altaan asemilta BCS III (579 yksilöä/m<sup>2</sup>) ja Gotland (580 yksilöä/m<sup>2</sup>). Näiden asemien vastaavat enimmäisyksilötiheydet olivat 14,7 yksilöä/m<sup>3</sup> ja 13,3 yksilöä/m<sup>3</sup>.

Keskimäärin arktisen kampamaneetin yksilömäärät ja tiheydet jäivät yllä esitettyjä huippulukemia paljon alhaisemmiksi ja vaihtelevat suuresti eri asemien välillä (Kuvat 6 a ja b, Liite 3).

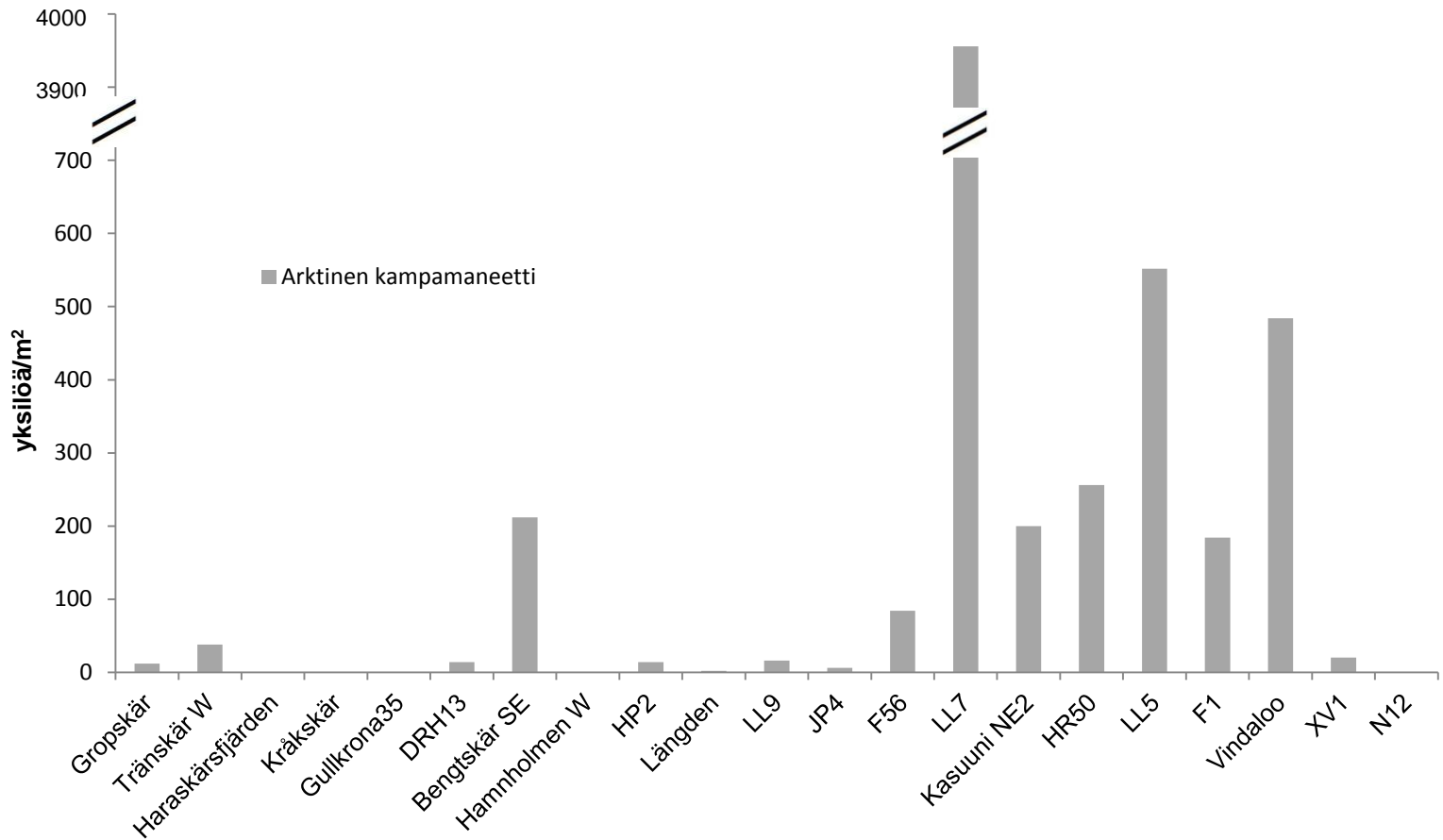
Suomenlahdella niillä asemilla, joilla lajia esiintyy, on yksilömäärä keskimäärin 378,1 /m<sup>2</sup> (139,6 yksilöä/m<sup>2</sup> jos asema LL7 jätetään pois laskusta) ja tiheys syvemmissä vesikerroksessa 8,6 yksilöä/m<sup>3</sup> (5,1 yksilöä /m<sup>3</sup> ilman asemaa LL7). Rannikkoasemilla yksilöitä oli vähemmän kuin keskellä lahtea. Koko eteläisellä näytealueellani yksilömäärä oli (niillä asemilla, joilla lajia esiintyi) keskimäärin 234,5 /m<sup>2</sup> ja enimmäistiheyksien keskiarvo 5,9 yksilöä/m<sup>3</sup>. Tälläkään alueella rannikkoasemilla ei juuri ollut kampamaneetteja. Yksilömäärä laski etelään siirryttäessä niin, että Gotlannin altaalla se oli 538,2 yksilöä/m<sup>2</sup>, Gdanskien altaalla 85,5 yksilöä/m<sup>2</sup> ja Bornholmin altaalta löytyi enää alle yksi yksilö neliöllä. Pohjanmeren suulta lajia ei löytynyt lainkaan.

Monilta pohjoisemmiltakaan näyteasemilta arktista kampamaneettia ei löytynyt. Tyypillisesti tällaiset asemat olivat lähellä rannikkoa ja aineistoni matalimpia, keskimäärin 59,8 m, kun lajin esiintymisasemien keskisyvyys on 89,2 m. Suomenlahdella näillä maneeettomilla rannikkoasemilla vesi on lämpimämpää (syvemmän vesikerroksen keskilämpötila 9,4 °C) ja vähäsuolaisempaa (suolapitoisuuden keskiarvo 6,0) kuin niillä asemilla, joilla kampamaneetteja esiintyi (vastaavat keskiarvot 7,8 °C ja 6,6).

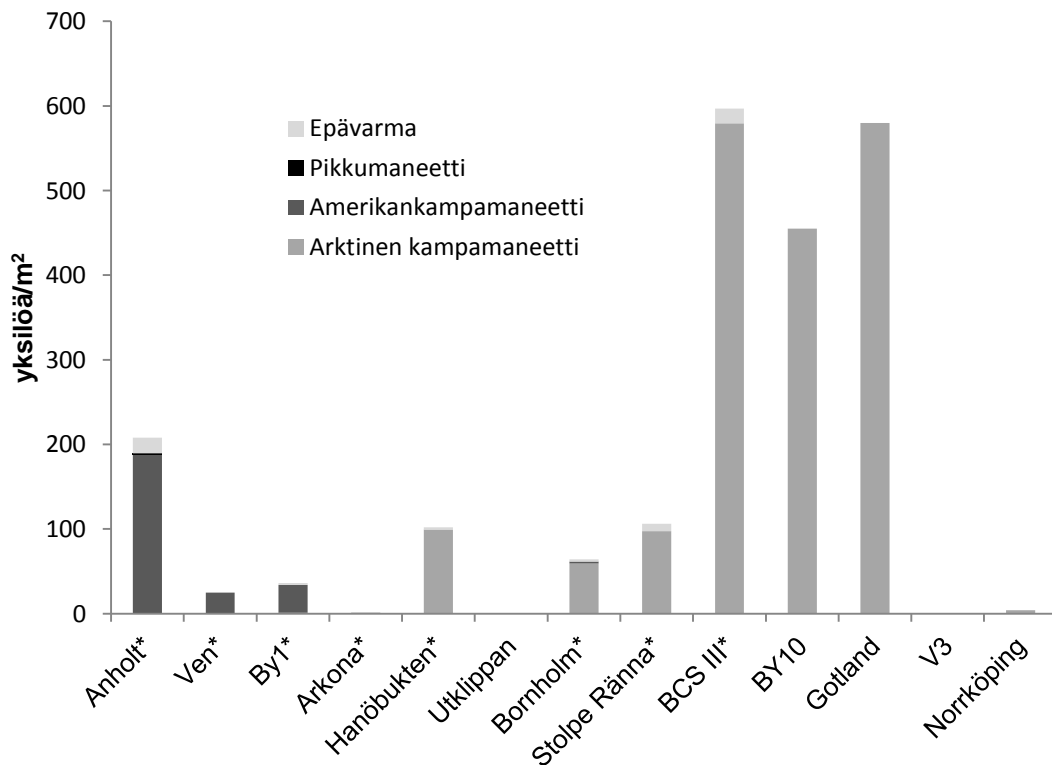


Kuva 5. Arktisen kampamaneetin ja amerikankampamaneetin esiintymisen raja Itämerellä loppukesällä 2009 esitettyä syvyyskartan päällä. Karttaan on merkitty rastilla ne asemat, joilta ei tullut lainkaan kampamaneetteja, mustalla pisteellä ne, joilla vallitseva tai ainoa laji oli arktinen kampamaneetti ja tähdellä ne, joilla vallitseva laji oli amerikankampamaneetti. Pieni merkki tarkoittaa alle sataa yksilöä/m<sup>2</sup> ja suurempi yli sataa yksilöä/m<sup>2</sup>. Yhtenäinen musta viiva kuvaa arktisen kampamaneetin eteläisintä/läntisintä esiintymistä ja katkoviivat kuvaavat amerikankampamaneetin pohjoisinta/itäisintä esiintymistä. A:lla merkitty katkoviiva on piirretty omien näytteideni perusteella ja B:llä merkitty tutkimusmatkan tarkemmissa näytteenotoissa havaittujen pyyntiliuskallisten yksilöiden perusteella.

a) Suomenlahti 3.8.-3.9.2009



b) Etelä-Itämeri 12.10.-23.10.2009



Kuvat 6 a ja b. Kokonaisyksilömäärät vesipatsaassa pohjan yhtä neliömetriä kohti: a) Suomenlahdella näyteasemat järjestetty lännestä itään, Saaristomereltä kohti Suomenlahden pohjukkaa, b) eteläisellä Itämerellä näyteasemat järjestetty Ruotsin rannikkoa mukaillen lännestä itään ja pohjoiseen. Tähdellä merkityiltä asemilta havaittiin näytteenottoristeilyn aikana pyyntiliuskallisia suuria amerikankampamaneetteja.

### 3.2 Arktisen kampamaneetin esiintyminen eri syvyyksissä

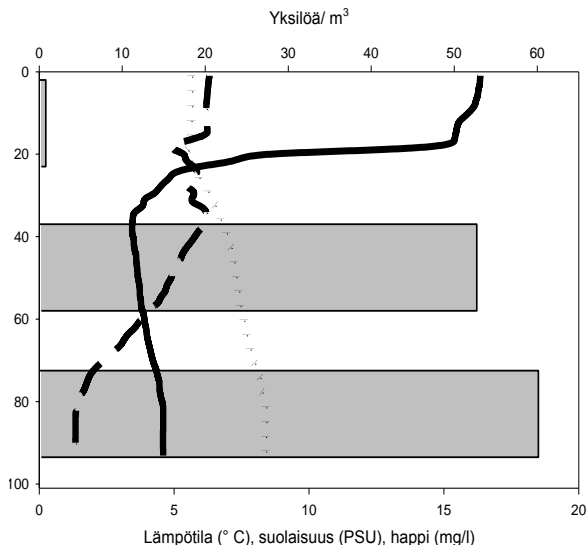
Itämeren arktiset kampamaneetit elävät pääasiassa syvimmissä vesikerroksissa. Varsinkin loppukesällä kerätyissä Suomenlahden näytteissä tämä on selkeä tulos lähes kaikkien pintanäytteiden jäädessä tyhjiksi (Kuvat 7 a ja b sekä 8 a). Samankaltainen tulos saatiin myös lokakuussa kerätyissä eteläisen Itämeren näytteissä, mutta niissä suurempi osa maneeteista on myös pintakerroksissa (Kuvat 7 c ja d sekä 8 b). Aineistoni kaikista arktisen kampamaneetin yksilöistä 85 % oli lämpötilan harppauskerroksen alapuolisissa näytteissä. Kesäisen Suomenlahden osalta prosentti on peräti 99,6 %, ja lokakuisista etelän yksilöistäkin 69 % viihtyi lämpötilan harppauskerroksen alapuolella.

Lämpötilan keskiarvot maneettinäytteenottojen vesipatsaissa vaihtelevat välillä 3,4–17,8 °C, suolapitoisuuden keskiarvot vaihtelevat välillä 4,3–12,4 ja happipitoisuuden keskiarvot vaihtelivat välillä 0,1–7,7 mg/l (keskiarvon ollessa kuitenkin 5,9 mg/l, eli hyvin vähähappisia vesialueita ei aineistossani juuri ole). Nämä luvut on laskettu vain niiltä alueilta, joilta löytyi arktista kampamaneettia. Havaitsin, että näistä muuttujista arktisen kampamaneetin esiintymiseen eri vesikerroksissa vaikuttavat sekä lämpötila ( $p=0,001$ ) ja että suolaisuus ( $p=0,001$ ) (Liite 2). Arktinen kampamaneetti on runsaslukuisempi viileämmässä ja suolaisemmassa vedessä. Suolapitoisuuden vaikutus yksilömäärään muuttuu leveyspiirin mukaan siten, että pohjoisempana sillä näyttäisi olevan enemmän merkitystä kuin etelämpänä ( $p=0,012$ ).

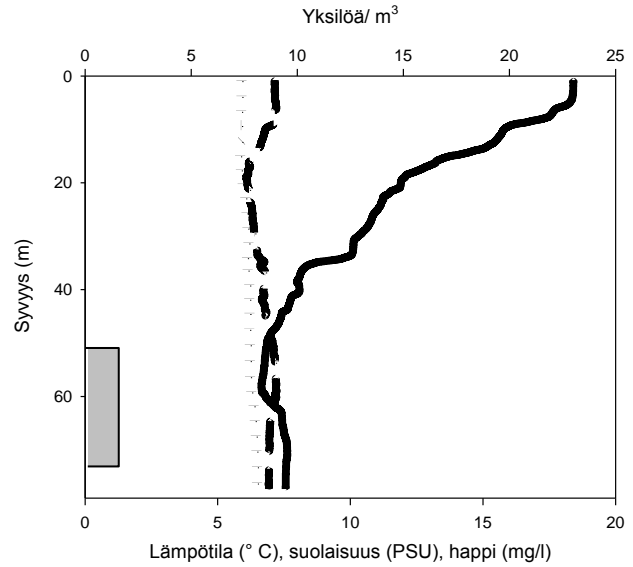
### 3.3 Arktisen kampamaneetin koko Itämerellä

Arktinen kampamaneetti on Itämerellä pienikokoista. Suurimmat havaitsemani yksilöt olivat vain 2,5 mm kokoisia ja lähes kaikki yksilöistä kuuluivat pienimpiin kokoluokkiin 0,5 mm (59 %) tai 1 mm (33 %) (Kuvat 8 a ja b). Wilcoxonin testin mukaan Suomenlahden yksilöt ovat merkitsevästi suurempia kuin eteläisen Itämeren ( $p<0,001$ ).

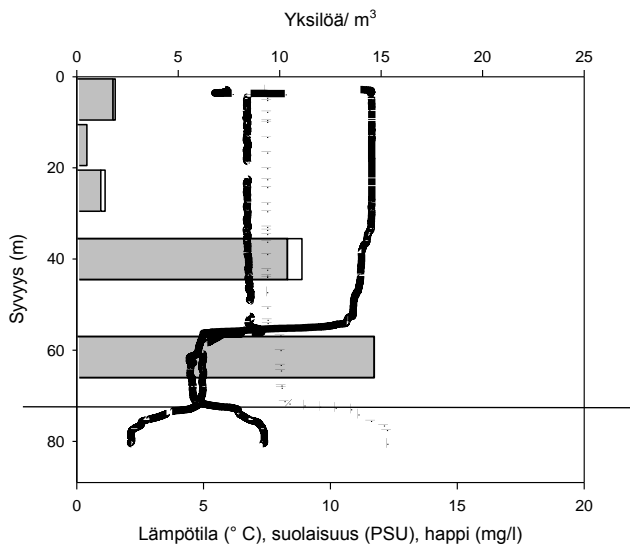
a) LL7 (vesipatsas jaettu kolmeen osaan)



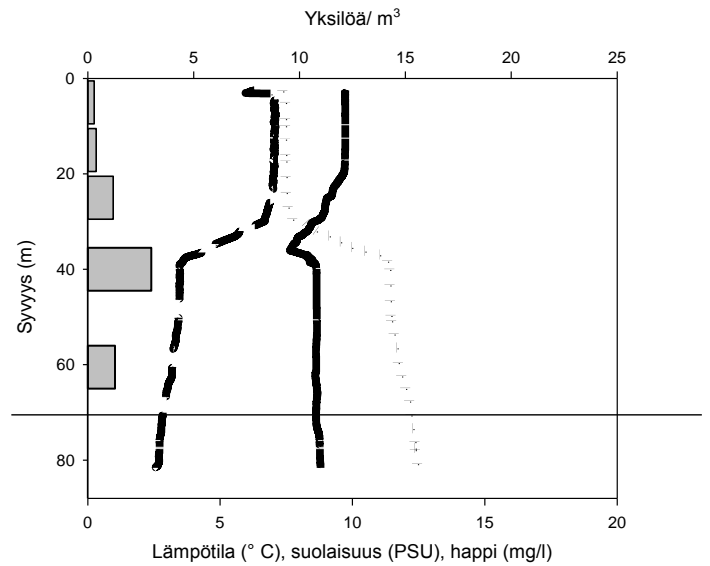
b) Transkär W (vesipatsas jaettu kahteen osaan)



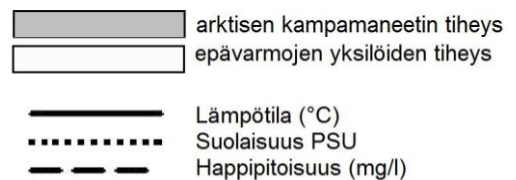
c) BCS III (vesipatsas jaettu viiteen osaan)

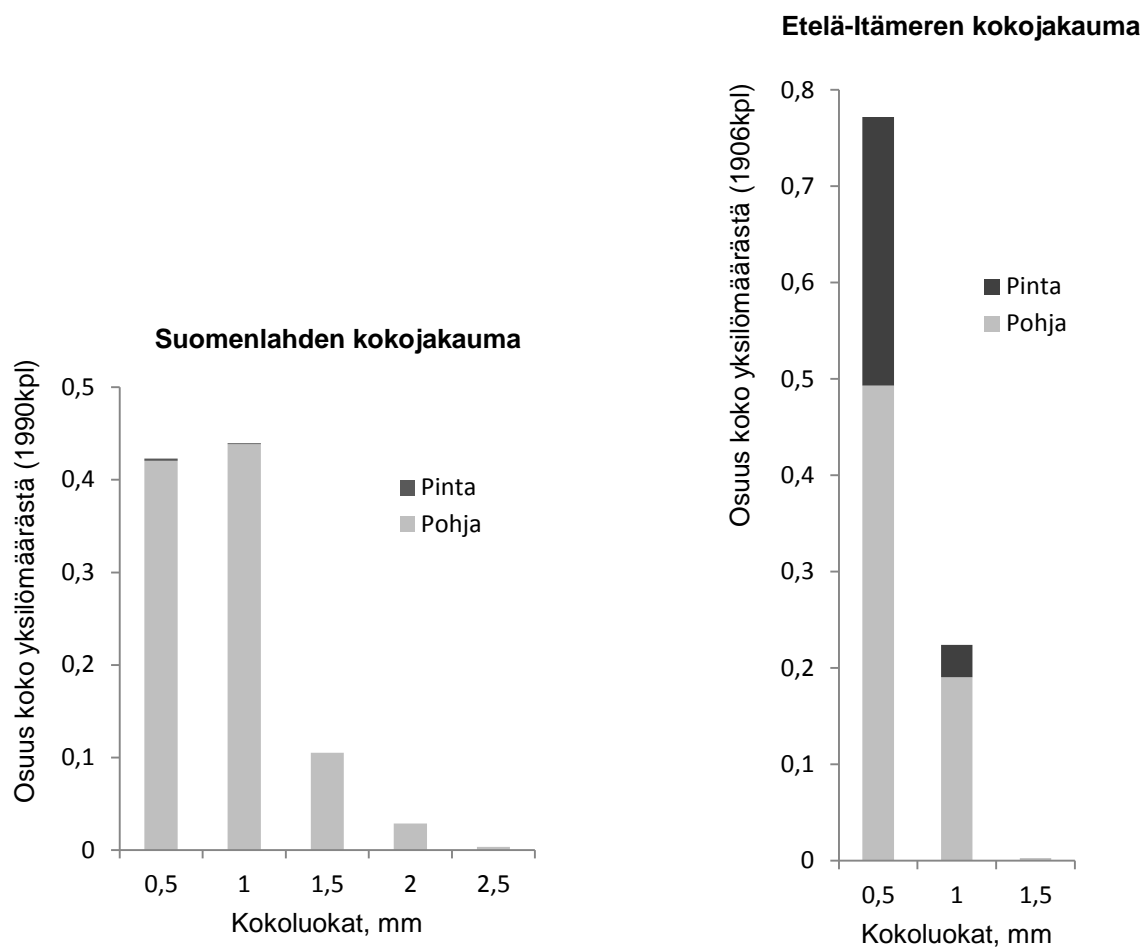


d) Stolppe (vesipatsas jaettu viiteen osaan)



Kuvat 7 a, b, c ja d. CTD-kuvaajat ja eri kampamaneettilajien yksilötiheydet eri näytteenottokerroksissa AFLP:ssä käytetyistä näytesteistä LL7, Transkär W, BCS III ja Stolppe. Kuvaajissa c ja d vaakaviiva kuvaa syvimmän haavinvedon alkamiskohtaa, kun kuvaajissa a ja b tämä haavinvento alkoi 5 m pohjan yläpuolelta. Huomaa runsausakselien erilaiset skaalat.





Kuva 8 a ja b. Kuvaajiin on laskettu eri kokoluokkien arktisen kampamaneetin yksilöiden osuudet merialueiden koko yksilömäärästä. Palkin kaksi eri väriä kuvaavat yksilöiden jakautumista (karkeasti) termokliinin ylä- ja alapuolelle.

### 3.4 AFLP-tulokset

Analyysit perustuivat 653 polymorfiseen lokukseen. Miltään yksilöltä ei puutu analyyseissä käsiteltyjä lokuksia. AFLP-menetelmän luotettavuutta arvioitiin rinnakkaisnäytteiden avulla. Kaikilla lopullisiin analyyseihin mukaan otetuilla alukeyhdistelmillä rinnakkaisnäytteiden välinen virheprosentti on keskimäärin 7,18 % (Taulukko 5).

Geneettisen vaihtelun määrä on samansuuruista kaikilla näytepisteilläni. Nein (1987) geneettinen diversiteetti vaihteli välillä 0,15–0,20 ja polymorfisten lokusten osuus oli 46,25–62,79 %. Pohjoisen näyteenottopisteillä geneettinen vaihtelu näyttäisi olevan hiukan matalampaa kuin etelän pisteillä (Taulukko 6). Aineiston geneettisestä vaihtelusta noin kymmenen prosenttia oli näytepisteiden välistä ja 90 % näytepisteiden sisäistä (taulukko 7). Suomenlahden eri asemilta kerättyjen

yksilöiden välillä ei ollut merkitsevää geneettistä eroa, eteläisen Itämeren asemien yksilöiden välillä sitä on hiukan, ja suurin havaittu ero on eri alueilta kerättyjen yksilöiden välillä (Taulukko 8). Kuvan 9 mukaan näytepisteiden välillä oleva geneettinen etäisyys ( $F_{ST}$ ) näyttää korreloivan selvästi näytepisteiden välisen maantieteellisen etäisyyden (km) kanssa. Mantelin testin mukaan tämä ei kuitenkaan ole tilastollisesti merkitsevä tulos ( $p=0,28$ ).

Taulukko 5. Kullakin alukeyhdistelmällä saatujen lokusten määrä, virheprosentit (mismatch error) sekä alleelien yleisyys (band presence).

Aluke-yhdistelmä	Lokuksia	Virhe-%	Alleelien yleisyys (ka-%)
1	121	6,04	18,61
2	163	8,41	18,11
3	133	9,02	26,00
4	103	5,90	10,40
5	133	6,54	13,28
Keskiarvo:	131	7,18	17,28
Yhteensä:	653		

Taulukko 6. Nein geneettinen diversiteetti  $H^{AFLP}$  (Nei 1987), lokusten polymorfisuus (PP) sekä alleelien yleisyys (band presence) kullakin näytepisteellä.

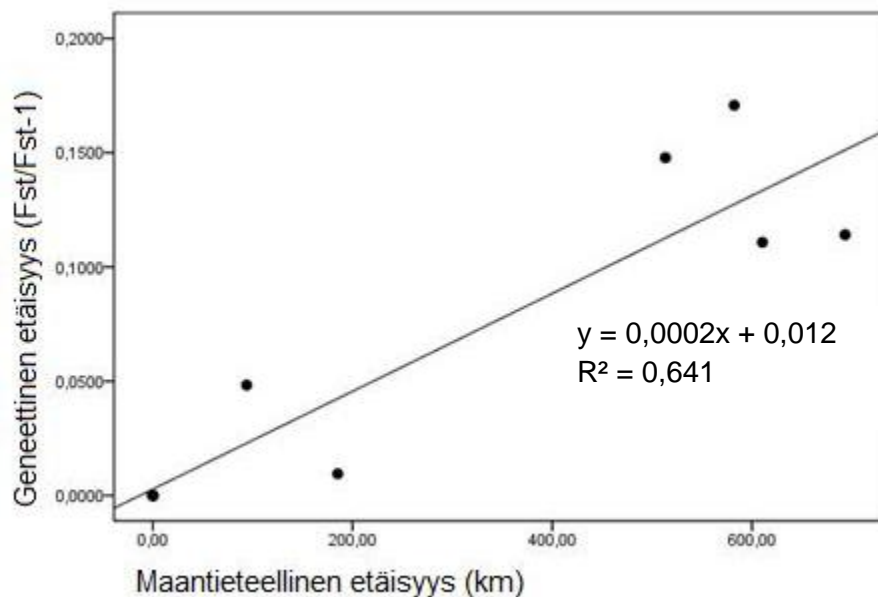
Näytepiste	n	Lokuksia	PP (%)	$H^{AFLP}$	Alleelien yleisyys (ka-%)
Transkär	10	653	52,83	0,17	20,69
LL7	10	653	46,25	0,15	16,65
Stolppe	10	653	62,79	0,20	15,18
BCS	10	653	57,73	0,18	18,09
Keskiarvo			54,52	0,18	17,65

Taulukko 7. Molekyylivarianssianalyysi (AMOVA)

Vaihtelu	Vapaus-asteet	Neliöiden summa	Varianssi-komponentit	% kokonaisvaihtelusta	$F_{ST}$	p-arvo
Näytepisteiden välillä	3	379,7	6,8	10,5	0,10	<0.001
Näytepisteiden sisällä	36	2101,1	58,4	89,5		

Taulukko 8. Ryhmien parittaiset erot ( $F_{ST}$ :t), merkitsevät arvot merkitty \*:llä ( $p < 0,01$ )

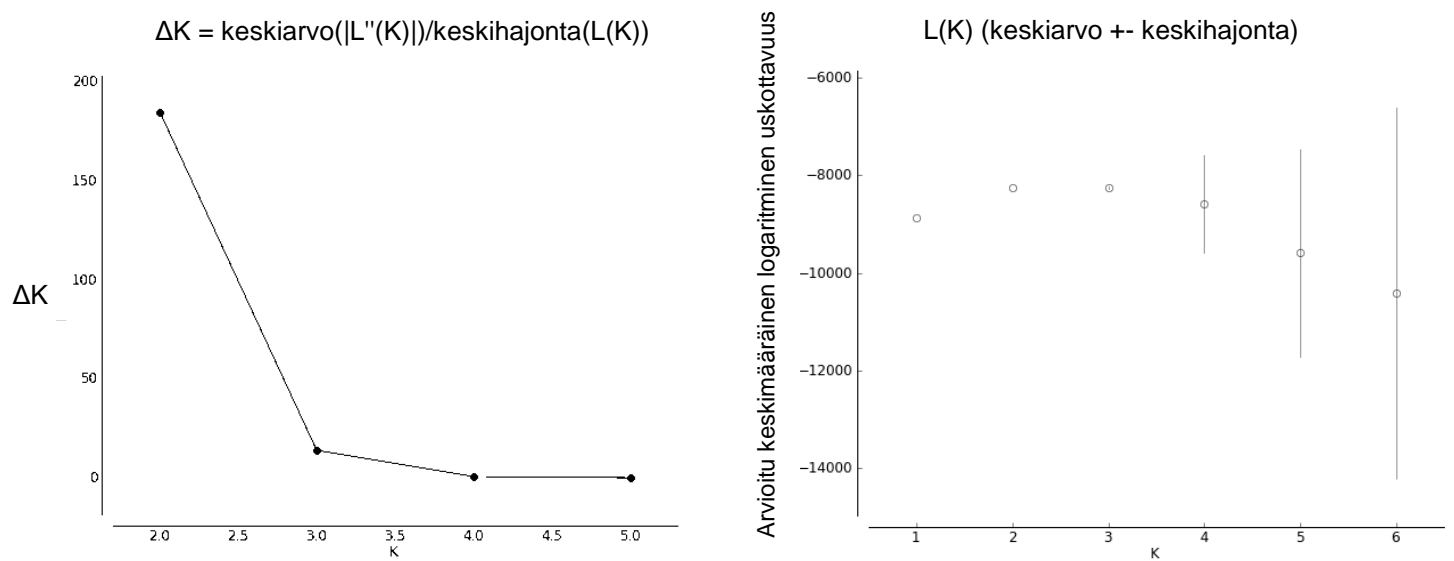
Näytepisteet	Transkar	LL7	Stolppe	BCS
Transkar	0			
LL7	0,01	0		
Stolppe	0,17*	0,11*	0	
BCS	0,15*	0,11*	0,05*	0
Populaatiot	Etelä	Pohjoinen		
Etelä	0			
Pohjoinen	0,12*	0		



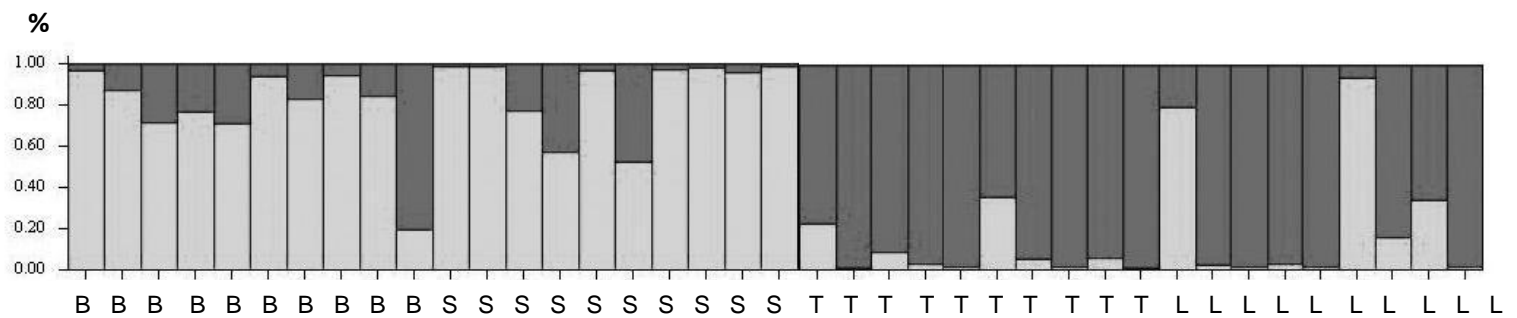
Kuva 9. Näytepisteiden välinen geneettinen etäisyys ( $F_{ST}$ ) näytepisteiden välisen maantieteellisen etäisyyden (km) suhteen, sekä pisteiden kautta sovitettu suora, sen kaava ja korrelaatiokerroin ( $R^2$ ).

Structure-ohjelma havaitsi aineistossani kaksi toisistaan eroavaa populaatiota (Kuvat 10 a ja b). Tulosten perusteella etelän ja pohjoisen yksilöt muodostavat omat, toisistaan eroavat populaationsa, mutta populaatioiden välillä on havaittavissa geenivirtaa (Kuva 11). Myös aineiston pohjalta piirretty UPGMA-puu heijastelee Structuren havaitsemaa populaatorakennetta (Liite 4).





Kuvat 10 a ja b.  $\Delta K$  ja  $L(K)$  –kuvaajat todennäköisimmästä populaattiorakenteesta Structuren ja Structure Harvesterin mukaan. Todennäköisin populaatioiden määrä on kaksi.



Kuva 11. Structuren pylväsdiagrammi. B=BCS, S=Stolppe, T=Transkär ja L=LL7. Kukin pylväs kuvastaa yhtä yksilöä kyseiseltä näytteenottopisteeltä. Pylväiden kaksi eri väriä kuvastavat Structuren löytämää kahta erilaista populaatiota. Kussakin yksilössä on tietty prosenttiosuus kummankin populaation ominaisuuksia. Populaatioiden välinen geenivirta näkyy siten, että kussakin yksilössä on molempien populaatioiden piirteitä.

## 4 Tulosten tarkastelu

Tutkimusalueen näytteenotoista saimme koko Suomenlahden kattavan, laajan aineiston. Otokseni on sen verran suuri, että on turvallista vetää johtopäätöksiä koko alueen lajistokoostumuksesta. Vaikka aineistoni ei katakaan koko vuotta eikä siinä näy mahdollinen vuodenaikaisvaihtelu lajien levinneisyyksissä, uskallan sen perusteella vetää ainakin seuraavat johtopäätökset: Arktinen kampamaneetti on vastoin julkaistua kirjallisuutta Suomenlahden ainoa kampamaneettilaji. Sen populaatio on vahvimmillaan pohjoisella Itämerellä ja Gotlannin altaalla, mistä lajin runsaus laskee etelää ja länttä kohden. Pikkumaneettia ei esiinny pohjoisella Itämerellä. Eteläisimmälläkin Itämerellä se on ainakin nykyisin vähintäänkin harvinainen. Amerikankampamaneetti ei ole Itämerellä levinnyt niin pohjoiseen kuin aiemmin on raportoitu.

### 4.1 Amerikankampamaneetti ei ole levinnyt pohjoiselle Itämerelle

Olen tässä tutkielmassa jättänyt amerikankampamaneetin sivurooliin, vaikka sen ilmestyminen Itämerelle oli syynä myös tämän tutkimusprojektin aloitukselle. Aineistoni amerikankampamaneetista jäi pieneksi, enkä muutaman näytepisteeni perusteella voi vetää johtopäätöksiä lajin ekologiasta eteläisellä Itämerellä. Samoilta merialueilta on ilmestynyt vastikään tutkimuksia, jotka valottavat lajin levinneisyyttä ja leviämispotentiaalia (esimerkiksi Jaspers ym. 2011), ja tutkimus tällä saralla jatkuu kiivaana.

Osaa amerikankampamaneettia koskevista tutkimuksista on kuitenkin edelleen syytä lukea suurella varauksella: esimerkiksi amerikankampamaneetin kannibalismia tutkineet Javidpour ja muut (2009 a) eivät mainitse lainkaan, kuinka tutkimuksen lajisto on määritetty. He väittävät myös edelleen, että amerikankampamaneetti on levinnyt koko Itämeren alueelle (Javidpour ym. 2009 b), vaikka artikkelin kirjoitusaikaan oli jo tiedossa, ettei näin ole. On mielestäni melko rohkeaa olettaa ilmeisesti ilman mitään lajinmäärittystä, että kaikki tutkimusalueen pienet yksilöt ovat amerikankampamaneettia. Koko Itämeren alueella on ehdottomasti käytettävä molekyylibiologisia menetelmiä lajintunnistuksessa. Lajinmäärittäminen totuudenmukaisuus on näiden eläinten kohdalla äärimmäisen tärkeää. Ei ole mielekasta tehdä ekologista tutkimusta, jossa ei voi olla varma, mitä lajia ollaan tutkimassa.

Omasta aineistostani voi amerikankampamaneetin osalta todeta, ettei sitä esiinny pohjoisella Itämerellä toisin kuin Lehtiniemi ja muut (2007) raportoivat. Lienee turvallista olettaa, ettei se ole

koskaan levinnyt Bornholmin allasta pohjoisemmas. Uusimpien julkaisujen mukaan amerikankampamaneetin levinneisyys Itämerellä on vastaava kuin oman aineistoni antama levinneisyys (Jaspers ym. 2011, Jaspers ym. 2012 b).

#### **4.2 Pikkumaneetti Itämerellä?**

Tutkimuksestani käy selkeästi ilmi, että arktinen kampamaneetti elää koko Itämeren altaan alueella. Yksilömäärät ovat vaihtelevia, mutta samansuuntaisia laajalla alueella, joten populaatio vaikuttaisi olevan vakaa. On mahdollista ja todennäköistä, että arktinen kampamaneetti on elänyt Itämeressä jo viime jääkaudesta lähtien, ja se on määritetty virheellisesti pikkumaneetiksi aiemmin tehdyissä kartoituksissa (muiden muassa Levander 1901, Mielck 1926, Lindquist 1958, Vuorinen 1987).

Pikkumaneetti on jo pienikokoisena tyypillisesti jyrkempi kuin muut kampamaneettilajit, ja säilyttää muotonsa myös vedestä nostettuna (Mielck 1926), mutta Itämeressä esiintyvät kampamaneetit ovat aina olleet hentoisia ja helposti hajoavia. Tämä on erikseen raportoitu sekä pohjoiselta (Vuorinen 1987) että eteläiseltä Itämereltä (Mielck 1926). Vuorinen (1987) arvelee rakenne-eron syyksi pohjoisen Itämeren vähäsuolaisuutta. Todennäköisempi syy tähän havaintoon lienee se, että jo viime vuosisadalla näillä alueilla eli arktista kampamaneettia pikkumaneetin sijaan. Menneiden vuosikymmenten tutkijoita on myös kummastuttanut havainto siitä, että lajin esiintyminen Itämerellä on painottunut pohjoiseen, ja sen lukumäärät vähenevät etelää kohden – vaikka pikkumaneetti on yleinen heti Tanskan salmien ulkopuolella Pohjanmerellä (Mielck 1926, Mielck & Künne 1935, Vuorinen & Vihersaari 1989). Myös tämä viittaa siihen että aiempi lajinmääritys on ollut virheellinen. Näitä spekulatioita vahvistaa se, että vastikään saatiin eristettyä lajinmääritystä varten muutaman 1980-luvulla Selkämereltä kerätyn ja kuivattamalla säilötyn kampamaneettiyksilön DNA. Nämä yksilöt olivat arktista kampamaneettia (Maiju Lehtiniemi, julkaisematon aineisto).

Toisaalta vanhojen tutkimusten (Mielck 1926, Mielck & Künne 1935) mukaan kampamaneettimäärät nousevat taas Bornholminlahdelta Tanskan rannikkoa ja Pohjanmerta kohti siirryttäessä. Itse tulkitSEN tämän vanhan tuloksen nykytietämyksen valossa niin, että nämä Tanskan rannikolla tutkitut kampamaneetit ovat todella olleet pikkumaneettia. Lajin yksilömäärät ovat hiipuneet Tanskan rannikolta Bornholmin altaalle, mistä puolestaan arktisen kampamaneetin yksilömäärät ovat alkaneet nousta siirryttäessä Gdanskin altaalle ja siitä pohjoisemmaksi. Jaspers (2012 b) toteaa, että arktinen kampamaneetti levittäytyy näiltä kesäisiltä levinneisyysiltään talvisin

ja loppukesästä myös Tanskan salmiin, joten osa viime vuosisadalla alueelta raportoidusta pikkumaneettipopulaatiosta on voinut olla tätäkin lajia.

Javidpour ja muut (2009 a) ovat havainneet, että kesästä 2006 lähtien Tanskan rannikolla Kielinlahdella ei ole enää havaittu pikkumaneettia, vaikka se on ennen ollut alueella yleinen varsinkin talvisin (Hillebrandt, 1972). Omassakaan aineistossani ei lajia tällä alueella esiinny. Lajin häviämisen syyksi on ehdotettu sekä amerikankampamaneetin saapumista alueelle että veden lämpötilan hienoista nousua ilmastonmuutoksen seurauksena (Javidpour ym. 2009 a).

#### **4.3 Arktisen kampamaneetin yksilömäärät ja tiheys**

Suomenlahdelta laskemani arktisen kampamaneetin yksilömäärät ja -tiheydet (keskimäärin 378,1 m<sup>2</sup> ja 8,6 m<sup>3</sup>) ovat melko samansuuntaisia kuin pohjoiselta Itämereltä aiemmin raportoidut kampamaneettien yksilömäärät ja -tiheydet. Nämä luvut on raportoitu pikkumaneettina, mutta edellä esitetyin perustein oletan niiden kertovan arktisesta kampamaneetista. Esimerkiksi (Sandstrom 1982) raportoi Pohjanlahden maksimimääräksi 2000 yksilöä/ m<sup>2</sup>. Vuorinen (1987) kartoitti kampamaneetteja samalla alueella syksyllä 1986, jolloin yksilömäärät vaihtelivat 357–2813 yksilöä/ m<sup>2</sup> ja tiheydet olivat maksimissaan 10 yksilöä/m<sup>3</sup>. Kaksi vuotta myöhemmin saatiin samansuuruksia yksilömääriä ja tiheyksiä sekä Pohjanlahdelta että Suomenlahdelta (Vuorinen & Viheraari 1989). Kampamaneettipopulaatio tuntuisi siis olevan melko vakaa vuodesta toiseen.

Gotlannin altaassa mittaamani yksilömäärät neliometrillä ovat samansuuruksia tai hiukan korkeampia kuin keskisellä Suomenlahdella. Näistä luvuista yksilömäärät laskevat tasaisesti etelään ja länteen päin. Myös tämä vastaa menneiden vuosikymmenten tulosta (Vuorinen & Viheraari 1989, Mielck 1926, Mielck & Künne 1935) kuin myös Jaspersin (2012 b) vastikään julkaisemia lukuja Bornholmin ja Gdanskin altailta (~0–400 yksilöä / m<sup>2</sup>) ja pohjoiselta Gotlannin altaalta (~500–2000 yksilöä / m<sup>2</sup>).

Aineistoni pohjoisen ja eteläisen Itämeren välillä ei ole aivan vertailukelpoista, sillä näytteet on otettu eri silmäkoon haaveilla eikä eteläisellä Itämerellä näytteitä ole otettu yhtä läheltä pohjaa kuin Suomenlahdella. Molemmat erot aiheuttavat varmasti aineistoon jossain määrin virhettä. Suuruusluokkien tasoinen tämä virhe ei kuitenkaan ole, ja arktisen kampamaneetin yksilömäärien hiipuminen pohjoisen ja keskisen Itämeren suurista yksilömääristä Tanskan rannikon nollalukemiin on selkeä. Maksimitiheyksien osalta aineistoani pohjoisen ja eteläisen Itämeren välillä ei kannata juuri vertailla, sillä vesipatsas on jaettu eteläisellä Itämerellä useampaan syvyysluokkaan kuin

pohjoisessa. Tämä johtaa suurempiin laskennallisiin tiheyksiin, jos yksilöt eivät ole jakautuneet tasaisesti koko vesipatsaaseen. Ylipäättään kampamaneettipopulaatioiden tiheyksien vertailua hankaloittaa näiden eläinten hyvin laikuittainen esiintyminen (Hirota 1974, Kremer & Nixon 1976).

Kampamaneettien vahvasti laikuittainen esiintyminen ilmenee eri näytepisteiltä mitattujen yksilömäärien suurena vaihteluna (Lundberg ym. 2006). Se on havaittavissa myös tässä opinnäytetyössä. Arktisen kampamaneetin ja muiden suurten hyytelöplanktonpetojen laikuittaisuudesta on saatu viime vuosikymmeninä yhä enemmän todisteita, kun niiden esiintymistä on alettu tutkia niiden omassa elinympäristössä, eli sukeltamalla (Swanberg & Båmstedt 1991) ja videokuvaamalla (Graham ym. 2003). Lajin on todettu esiintyvän hyvin tiukasti rajatussa vesikerroksessa (Swanberg & Båmstedt 1991). Tällöin lajin todelliset maksimitiheydet ovat paljon suurempia kuin pitkillä mutta kapeilla haavinvedoilla voidaan havaita.

Laikuittaista esiintymistä aiheuttavat sekä elinympäristön fysikaaliset ominaisuudet että eläinten käyttäytyminen: eläimet voivat esimerkiksi pyrkiä kohden pintaa, mutteivät pääse ylittämään eri suolapitoisuuksien aiheuttamaa fyysistä estettä, jolloin yksilötiheys tietyssä vesikerroksessa kasvaa. (Graham ym. 2001). Itämeren osalta Vuorinen ja Vihersaari (1989) toteavat kampamaneettien esiintyvän hyvin laikuittaisesti myös horisontaalisesti ja mainitsevat, että todellisen yleisyyden selvittämiseksi tulisi ottaa useita rinnakkaisnäytteitä samalta näytepisteeltä.

Tässä opinnäytetyössä otettiin joiltain pisteiltä rinnakkaisnäytteitä, mutta lähinnä riittävän suuren yksilömäärän takaamiseksi molekulaarista lajinmäärittystä varten. Riittämättömien rinnakkaisnäytteiden vuoksi tulee tässä työssä esitettyjä yksilömääriä ja tiheyksiä pitää vain suuntaa-antavina. Sama liian vähäisten rinnakkaisnäytteiden ja liian pienten näytetilavuuksien ongelma tosin valitettavasti koskee lähes kaikkea hyytelöplanktonitutkimusta. Swanberg ja Båmstedt (1991) arvioivatkin, että vaikka tutkimuksissa lasketut keskimääräiset yksilömäärät neliömetrillä vastaavat suunnilleen todellisuutta, kampamaneettien maksimitiheydet kuutiometrissä ovat todellisuudessa paljon planktonhaaveilla saatuja tuloksia suurempia.

Arktisella merellä arktisen kampamaneetin yleisyys vaihtelee suuresti. Enimmillään lajia on raportoitu esiintyvän 911 yksilöä/ m<sup>2</sup> (Siferd & Conover 1992), minkä sekä tässä opinnäytteessä saamani maksimimäärä että pohjoiselta Itämereltä 1980-luvulla raportoidut maksimimäärät ylittävät reilusti. Toisaalta samassa artikkelissa raportoidaan pintavesistä saaduksi enimmäistiheydeksi 70,4 yksilöä/m<sup>3</sup>, mikä on samaa suuruusluokkaa kuin Itämereltä veden pohjakerroksista mittaamani enimmäistiheydet. Arktisella merellä populaation enimmäiskoko saavutetaan keskikesällä, ja esimerkiksi Lundberg ja muut (2006) raportoivat eri alueiden keskiarvoiksi 3,5–95 yksilöä /m<sup>2</sup>. He

arvioivat lajin yleisen esiintymistiheyden olevan 0-4,7 yksilöä/m<sup>3</sup>. Percy (1989) on raportoinut enimmäismääräksi 25 yksilöä/m<sup>2</sup> ja yleisimmiksi määriksi ympäri vuoden noin neljä yksilöä/m<sup>2</sup>.

Näissä Arktiksella tehdyissä kartoituksissa ei mainita lainkaan pienimpiä kokoluokkia [ $< 3$  mm (esimerkiksi Swanberg & Båmstedt 1991)], joista koko Itämeren populaatio koostuu. Artikkeleista saa kuvan, ettei Arktiksella koskaan tavattaisi alle kolme- tai viisimillisiä yksilöitä, mitä on kovin vaikea uskoa. Se tarkoittaisi, että Itämeren yksilöt ovat munasta kuoriutuessaan jopa kymmenen kertaa pienempiä kuin Arktiksen pienimmät yksilöt. Missään näistä artikkeleista ei myöskään mainita, miksi pienimmät yksilöt puuttuvat aineistosta. (Purcell ym. 2010) sentään toteaa tämän epäsuhdan olemassaolon. Joko pienet yksilöt tuhoutuvat näytteenotossa tai ne jäävät pois näytteistä käytettyjen haavien suurten silmäkokojen vuoksi. Esimerkiksi Purcell ja muut (2010) käyttivät haavin silmäkokoa 800  $\mu$ m. Luultavimmin arktisen kampamaneetin yksilömäärät ja -tiheydet ovat siis todellisuudessa Arktiksella paljon suurempia kuin raportoidut yksilömäärät ja -tiheydet. Itämeren yksilömäärät, edes korkeimmillaan, siis tuskin todellisuudessa ylittävät Arktiksen yksilömääriä, vaikka nyt näyttäisikin siltä.

Arktiksella arktinen kampamaneetti on merkittävä peto (Percy & Fife 1981, Swanberg & Båmstedt 1991). Mitä tahansa laji käyttääkin ravinnokseen Itämerellä, sen vaikutus ravintoeliön populaatioon on väistämättä näillä yksilömäärillä huomattava – ja tähän asti täysin tutkimatta. Gorokhova ja muut (2009) esittävät, että syvällä elävän ja pienikokoisen lajin ravinto koostuisi pääasiassa mikrop planktonista kuten nuorimpien, pyyntilonkerollisten amerikankampamaneettien ravinnon on osoitettu koostuvan (Sullivan & Gifford 2004). Lajin merkitys ja paikka alueen ravintoverkoissa voi siis olla hyvin erilainen kuin muilla maailman merillä. Toisaalta lajin pienten yksilöiden ravinnon koostumusta ei ole Arktiksellakaan tutkittu.

#### **4.4 Arktisen kampamaneetin esiintymissyvyys Itämeressä**

Arktista kampamaneettia ei ole tätä ennen raportoitu murtovedestä (Gorokhova ym. 2009), vaan sitä on pidetty pelkästään arktisen ulapan ja merenlahtien lajina. Itämeren populaatio sen sijaan näyttäisi olevan nimenomaan pohjoisten ja keskisten osien murtoveteen sopeutunut, sillä lajin yksilömäärät ovat korkeimmillaan merialueen pohjois- ja keskiosissa.

Vaikka tämän mereisen lajin asettuminen hyvin vähäsuolaiseen Itämereen vaikuttaa äkkiseltään mahdottomalta, se ei loppujen lopuksi olekaan niin kaukaa haettua. Arktiksella laji elää pintavesissä, joissa suolapitoisuus on ympäri vuoden hiukan valtamerten normaalia suolapitoisuutta

alhaisempi (Purcell ym. 2010). Varsinkin jään sulamisaikaan suolapitoisuus voi aivan pinnan tuntumassa hetkellisesti laskea jopa viiteen (Percy 1989), mikä vastaa jo Itämeren suolapitoisuuksia. Laji lienee sopeutunut vaihteleviin ja ajoittain mataliin suolapitoisuuksiin kaikilla elinalueillaan. Itämerestä se on löytänyt sopivan elinalueen syvänteiden kylmästä ja hiukan suolaisemmasta vedestä.

Aiemmin on todettu, että Itämeren kampamaneetit eivät elä alle 6,5:n suolapitoisuudessa (Hernroth & Ackefors 1979, Vuorinen 1987). Lisäksi Jaspers (2012 a) toteaa, että arktinen kampamaneetti pysyttelee Itämerellä  $-0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$  ja  $11,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  välillä. Myös omassa aineistossani lämpötilan ja suolaisuuden rajat ovat samansuuntaisia. Nämä ehdot täyttyvät kesäaikaan vain syvimmissä vesikerroksissa, joista lähes kaikki yksilöt löytyivätkin.

Sekä suolaisuus että lämpötila ovat aineistoni mukaan merkittäviä tekijöitä yksilöiden jakautumisessa eri vesikerrosten välillä. Koska ainakin lämpötila vaihtelee vuodenaikojen mukaan huomattavasti, saattaa vuodenaikaisvaihtelua olla kampamaneettien esiintymissyvyyksissäkin. Syksyllä pintaveden lämpötila laskee pohjaveden lämpötilan tasalle, ja eri vesikerrokset pääsevät sekoittumaan helpommin kuin kesällä. Tällöin kampamaneeteille sopiva vesialue saattaisi laajentua ja laji nousta lähemmäs pintaa. Tästä on alustavia havaintoja sekä vanhassa (Sandstrom 1982) että uudemmassa tutkimuksessa (Maiju Lehtiniemi, julkaisematon aineisto, Jaspers ym. 2012 a ja b).

Myös omasta aineistostani on havaittavissa, että eteläisellä Itämerellä syksyllä otetuissa näytteissä osa yksilöistä on lähempänä pintaa kuin Suomenlahden kesäisissä näytteissä. Valitettavasti tähän opinnäytetyöhöni ei sisälly kunnollista vuodenaikaisseurantaa yhden merialueen sisällä. Tässä esitetystä kahden eri merialueen aineistosta ei voi vetää lopullisia johtopäätöksiä eläinten liikkumisesta vuodenajan mukaan. Sitäkään vaihtoehtoa, että havaittu ero olisikin eri merialueiden välinen, ei voi sulkea pois.

Vielä kolmas, joskin melko epätodennäköinen, aineistossani havaittavaa syvyyseroa selittävä tekijä voisi olla kampamaneettien liikkuminen vuorokauden mukaan eri vesikerroksissa. Ensimmäisenä vuorokaudenaikojen mukaan tapahtuvaa liikkumista kampamaneeteilla havaitsi Rowe (1971) havaijilaisessa pikkumaneettipopulaatiossa. Myös Itämereltä on viitteitä siitä, että kampamaneetit nousisivat yöaikaan hiukan lähemmäs pintaa (Vuorinen & Vihersaari 1989), mutta tämän käytöksen todistamiseksi tarvitaan lisää aineistoa. Koska omasta pienestä, eri asemilta ja eri vuodenaikaan kerätystä aineistostani ei voi vetää mitään todellisia johtopäätöksiä aiheesta, jätän spekulatiosi tälle tasolle. Tyydyn toteamaan jälleen kerran, että tätäkin olisi mielenkiintoista tutkia tulevaisuudessa.

#### 4.5 Arktisen kampamaneetin pieni koko Itämeressä

Itämereltä ei löytynyt lainkaan muutamaa milliä suurempia yksilöitä, ja valtaosa aineistoni yksilöistä on alle millimetrin kokoisia. Suurimmat koskaan raportoidut yksilöt (jotka uskallan tulkita arktiseksi kampamaneetiksi) on kerätty Pohjanlahdella, ja ne olivat jopa sentin kokoisia (Vuorinen 1987). Viime vuosilta enimmäiskooksi on raportoitu 6,5 mm Pohjanlahdella ja 3 mm Suomenlahdella (Gorokhova ym. 2009). Arktiksella laji kasvaa huomattavasti suuremmaksi kuin Itämeressä. (Swanberg & Båmstedt 1991) raportoivat lajin maksimikooksi erään kartoituksen aikana 57 mm, ja keskimääräiseksi kooksi noin 17 mm. Itämeren yksilöt ovat siis kooltaan alle kymmenesosan Arktiksen yksilöiden koosta.

Lajin kääpiöitymistä Itämerellä voi selittää kolmella teorialla: 1) Lämpötila-koko –teoria ennustaa, että saman lajin yksilöt ovat lämpimillä alueilla keskimäärin pienempiä kuin kylmillä (Schmidt-Nielsen 1984) 2) Samoin murtovesi yleensä pienentää mereisten lajien kokoa (Kautsky & Tedengren 1992). 3) Elinkaarien evoluution teoria ennustaa, että luonnonvalinta voi suosia aikaista lisääntymiskykyä ja pientä lisääntymiskokoa, jos nuorten yksilöiden kuolleisuus on suurta (Stearns 1992). Luultavasti Itämeressä nämä kaikki mekanismit vaikuttavat samanaikaisesti, ja laji on sopeutunut paikallisiin olosuhteisiin.

Jaspersin ja muiden (2012 a) mukaan nimenomaan elinkaarien evoluution teoria tarjoaa todennäköisimmän vastauksen kysymykseen, sillä molempien fysikaalisten teorioiden mukaisesti lajin kääpiöitymisen ei pitäisi olla niin suurta kuin Itämerellä on havaittu. Jaspers ja muut (2012 a) jatkavat pohdintaansa niin, että tämä nuorten yksilöiden oletettu korkea kuolleisuus johtuisi tuntemattoman pedon aiheuttama saalistuspaineesta. Tutkijat arvelevat, että laji olisi viime jääkauden jälkeen ehtinyt sopeutua tämän hypoteettisen pedon aiheuttamaan saalistuspaineeseen ja kääpiöitynyt lähinnä sen seurauksena. Mielestäni tällainen spekulatio tässä vaiheessa tutkimusta on melko kaukaa haettua. Arktisen kampamaneetin paikka Itämeren ravintoverkossa on tällä hetkellä tuntematon. Sen käyttämästä ravinnosta ei ole varmaa tietoa. Myöskään sitä mahdollisesti ravinnokseen käyttävistä pedoista ei ole tehty tutkimusta Itämerellä.

Arktinen kampamaneetti on muilla elinalueillaan toisten kampamaneettilajien pääasiallista ravintoa (Falk-Petersen ym. 2002), mutta ainakaan pohjoisen Itämeren alueella ei elä muita kampamaneetteja. Monien meduusojen tiedetään syövän aikuisia kampamaneetteja (Purcell 1991), mutta Itämeren pintaosiin loppukesästä ajautuva korvameduusa (Hirche & Barz 2005) tuskin on pohjalla elävälle arktiselle kampamaneetille suuri uhka. Myös jotkin kalalajit käyttävät ravinnokseen kampamaneetteja (Harbison, 1993, Mianzan ym. 1996, Lundberg ym. 2006), mutta



ainoat olemassa olevat arviot kalojen aiheuttamasta saalistuspaineesta kampamaneettipopulaatiolle jäivät melko marginaalisiksi (Oviatt & Kremer 1977). Vuorinen (1987) arvelee, että merkittävien petojen puuttuessa Itämeren kampamaneettipopulaatiota voisivat rajoittaa lähinnä ympäristötekijät, ja että populaation koko olisi ympäristön kantokyvyn tasalla. Gorokhova ja muut (2009) ehdottavat, että laji saattaisi Itämeressä olla ravintona esimerkiksi massiäyriäisille (*Mysis spp.*), silakalle (*Clupea harengus membras*) ja kilohailille (*Sprattus sprattus*). Asiaa on tutkittava lisää, ennen kuin lajiin kohdistuvasta saalistuspaineesta ja sen mahdollisista evolutiivisista vaikutuksista voidaan vetää johtopäätöksiä.

Tulosteni mukaan arktisella kampamaneetilla on Itämeren eri alueiden välillä selkeä kokoero: Pohjoisen Itämeren yksilöt ovat merkitsevästi suurempia kuin eteläisen Itämeren yksilöt. Havaitsemani ero on samansuuntainen kuin aiemmin Suomenlahdelta ja Pohjanlahdelta kerätyssä aineistossa (Gorokhova ym. 2009). Oma havaintoni siis laajentaa tämän aiemmin pohjoiselta Itämereltä havaitun kokovaihtelun jatkumaan koko Itämeren alueelle. Mitä etelämmäs siirrytään, sitä pienempiä arktiset kampamaneetit ovat.

Itämeren alueiden välistä kokoeroa voidaan pyrkiä selittämään samoilla teorioilla kuin kokoeroa Arktiksen ja Itämeren välillä. Pohjoisessa kampamaneettien asuttamien vesikerrosten keskilämpötila on alhaisempi kuin etelässä, mikä saattaisi jo riittää selittämään havaitun kokoeron. Myös nuorten yksilöiden selviytyvyydessä voi olla eroja eri merialueiden välillä. Pohjoisessa vesi on makeampaa, minkä pitäisi teorian mukaan johtaa pienikokoisempiin yksilöihin (Kautsky & Tedengren 1992). Toisaalta niissä kerroksissa, joissa kampamaneetit esiintyvät, suolapitoisuus on suunnilleen sama kautta koko Itämeren, joten tämän teorian selitysaste ei lienee tässä tapauksessa kovin korkea. Toisaalta aineistossani havaittava kokoero saattaa ainakin osittain selittyä myös vuodenaikojen välisellä kokovaihtelulla, sillä Jaspers ja muut (2012 a) havaitsivat vastikään, että lajin keskimääräinen koko on Itämerellä suurimmillaan kesällä, todennäköisesti paremman ravintotilanteen vuoksi.

#### **4.6 AFLP:n soveltuvuus kampamaneeteille**

Tässä opinnäytteessä tärkein syy AFLP-menetelmän käyttöön oli sen testaaminen uudella pääjaksolla. Aineistoni ei ollut ihanteellista tälle menetelmälle, mikä näkyy eri alukeyhdistelmäni rinnakkaisnäytteiden välisessä virheprosenttissa. Se oli keskimäärin 7,18 % eli hiukan korkea. AFLP:ssä hyvänä virheprosenttina pidetään 2–5 %, tosin valtaosassa julkaistuista tutkimuksista ei ilmoiteta virheprosenttia lainkaan (Bonin ym. 2004). Tulevaisuudessa on tehtävä useita

parannuksia, jotta menetelmän luotettavuus ja vertailukelpoisuus kampamaneeteilla paranisi. Näiden parannusten jälkeen menetelmä näyttäisi kuitenkin toimivan erinomaisesti tällä pääjaksolla.

AFLP:n käytön kannalta aineistoni suurin heikkous on DNA:n määrä ja laatu. Näytteideni DNA on eristetty kahdella eri menetelmällä, mikä jo sinällään voi aiheuttaa virhettä tuloksiin (Benjak ym. 2006). Kumpikaan käyttämästäni metodeista ei myöskään ollut Itämeren pienille kampamaneeteille optimaalisin, ja DNA:n saanto jäi vähäiseksi. AFLP:n yksi perusvaatimus on suuri määrä puhdasta DNA:ta (Vos ym. 1995, Bensch & Åkerson 2005). Jatkossa on siis tärkeää löytää kampamaneeteille sopivampi DNA-eristysmenetelmä, jolla saadaan tarpeeksi paljon ja tarpeeksi puhdasta DNA:ta. Parempilaatuinen DNA vähentäisi myös kontaminaatoriskiä, kun DNA-näytteitä voisi laimentaa ennen ensimmäisiä työvaiheita.

Koska Itämeren kampamaneetit ovat hyvin pieniä, ja hyytelömaisissä eläimissä on lähtökohtaisestikin vähän DNA:ta suhteessa kokoon, on DNA:n eristykseen käytettävä koko yksilöä. Kampamaneetit pipetoidaan DNA:n eristystä varten omiin koeputkiinsa heti näytteenoton jälkeen. Hauraat eläimet kärsivät kaikesta käsittelystä, ja näytteenotossa ja pipetoinnissa tulee väistämättä jonkin verran ristikontaminaatiota eri yksilöiden välillä. Itse vaihdoin pipetinkärkeä aina yksilöiden välillä kerätessäni eläimiä AFLP-analyysihin. Myös ympäristöstä tuleva kontaminaatio on uhka AFLP-tulosten luotettavuudelle (Dyer & Leonard 2000). Helpoin tapa vähentää sitä on valita AFLP-näytteisiin vain sellaisia yksilöitä, joiden ruuansulatuskanavassa ei näy juuri syötyä ravintoa, ja pipetoida eläimen mukana mahdollisimman pieni määrä vettä. Sen sijaan eläinten pinnalla tulevaa bakteerikontaminaatiota on melko mahdoton vähentää edes eläimiä huuhtelemalla. Kampamaneettien pinnalla elää varsin monimuotoinen bakteerilajisto (Dinasquet ym. 2012). Jos näillä eläimillä tehdään jatkossa AFLP-tutkimusta, on tärkeää pystyä esittämään kunnollinen arvio myös bakteerikontaminaation määrästä. Ihanteellisessa tapauksessa pitäisi esittää arvio myös niiden monimuotoisuudesta, jotta olisi mahdollista päätellä, näkyykö se jossain määrin AFLP:n tuloksissa.

Tutkimuksessa, jossa arvioitiin AFLP-menetelmän sopivuutta symbionttiselle polttiäiseläinlajille (Amar ym. 2008) todettiin, että vasta 2,5 ng kontaminantti-DNA:ta (tässä tapauksessa noin tuhat leväsolua) näkyi tuloksissa uusina AFLP-markkereina. En pysty arvioimaan omien DNA-näytteideni kontaminaation tasoa, mutta ottaen huomioon, että niiden DNA-pitoisuus vaihtelee välillä 4–22 ng/μl, ja kokonaismäärä reaktion alussa välillä 30–182 ng, voisi olettaa, että ainakin valtaosa saamistani markkereista on todella kampamaneetti-DNA:ta, ja että tulokseni olisivat siis ainakin oikean suuntaisia.

Kun nämä menetelmän rajoitukset otetaan huomioon jo tutkimuksen suunnitteluvaiheessa, AFLP toimii kampamaneeteilla erinomaisesti. Sen eri sovelluksilla on varmasti vielä paljon annettavaa tämän pääjakson tutkimukselle.

#### **4.7 Arktisen kampamaneetin populaatiogenetiikka Itämerellä**

Kampamaneetit ovat hermafrodiitteja ja pystyvät lisääntymään itsesiitoksella (Pianka 1974). Tämän tarkempaa tietoa arktisen kampamaneetin lisääntymisstrategioista ei juuri löydy. Ei ole olemassa tutkimustietoa siitä, lisääntyykö laji pelkästään itsesiitoksella, vai onko sillä myös ristisiitosta ja missä määrin. On kuitenkin melko epätodennäköistä, että planktisen ja liikkumiskykyisen eläimen ainoaksi lisääntymistavaksi olisi kehittynyt itsesiitos. Se on ristisiitokseen nähden hyödyllistä lähinnä silloin, kun lisääntymiskumppanin löytäminen muuten olisi hyvin epätodennäköistä (Darwin 1876). Amerikankampamaneetilla vastikään tehdyssä mikrosatelliittitutkimuksessa havaittiin, että kaikissa lajin populaatioissa on Hardy-Weinbergin tasapainoa enemmän homotsygootteja (Reusch ym. 2010), mikä viittaa itsesiitokseen. Ero odotettuun heterotsygotia-asteeseen oli kuitenkin sen verran pieni, että itsesiitos lienee vain osittaista, ja myös ristisiitosta tapahtuu. Todennäköisesti näin on arktisen kampamaneetinkin kohdalla.

Itsesiitos on äärimmäistä sukusiitosta. Itsesiitoksella lisääntyvien lajien homotsygotia-aste on korkea (Brenner 1974). Niiden geneettinen vaihtelu on pienempää kuin ristisiitoksella lisääntyvien, koska yhteen geeniin kohdistuva valinta voi ajaa koko genomin kohden fiksaatiota (Charlesworth & Wright 2001). Esimerkiksi hermafrodiittisen ja pääasiassa itsesiitoksella lisääntyvän sukkulamato *Caenorhabditis elegansin* geneettinen vaihtelu on vähäistä (Koch ym. 2000, Sivasundar & Hey 2003, Barrière & Félix 2005). Toisaalta itsesiitoksella lisääntyvän lajin populaatioiden välinen geneettinen vaihtelu voi olla odotettua suurempaa, jos populaatioiden elinympäristöt eroavat merkittävästi toisistaan. Tällöin eri populaatioon siirtyminen on helposti yksilölle kohtalokasta, eikä sen geneilla ole mahdollisuutta jäädä uuteen populaatioon edes paremmin pärjäävien ristisiitoksella alkunsa saaneiden jälkeläisten kautta. Geenivirta olisi siis tässä tapauksessa vähäisempää kuin välimatkan perusteella voisi olettaa.

Itämeren kampamaneettien populaationsisäinen geneettinen vaihtelu on samansuuntaista kuin merieläimillä yleensä (Taulukko 9). Koska populaationsisäinen geneettinen vaihtelu ei ole muita eläimiä vähäisempää, näyttäisi siltä, että ristisiitosta tapahtuu arktisella kampamaneetilla säännöllisesti.

Taulukko 9: Lokusten polymorfisuus (PP) ja Nein geneettinen diversiteetti  $H^{AFLP}$  (Nei 1987) eri eläimillä kirjallisuuden mukaan. N tarkoittaa näytepisteiden määrää. Kaikissa näissä tutkimuksissa on käytetty menetelmänä AFLP:tä.

Laji	N	PP (%)	$H^{AFLP}$	Lähde
Simpukka <i>Coleomactra antiquata</i>	6	57,3–60,8	0,176–0,199	(Kong & Li 2009)
Kotilo <i>Babylonia areolata</i>	3	85,34–93,10	0,373–0,386	(Chen ym. 2010)
Juovakeltti <i>Mugil cephalus</i>	6	46,52–64,78	-	(Liu ym. 2009)
Arktinen kampamaneetti	4	46,25–62,79	0,15–0,20	oma aineisto

Aineistossani polymorfisten lokusten määrä ja Nein geneettinen diversiteetti ovat eteläisellä Itämerellä hiukan suurempia kuin pohjoisella. Sama ero pohjoisen ja etelän välillä on nähtävissä kaikissa analyyseissäni parittaisista  $F_{ST}$  -arvoista Structuren tuloksiin ja UPGMA-puun haarojen pituuksiin asti. Pohjoisen populaatio on geneettisesti tasaisempi ja etelän yksilöiden välillä on enemmän vaihtelua. Pohjoisella Itämerellä myös lajin yksilömäärä ja yksilöiden koko ovat etelää suurempia, mikä voisi viitata siihen, että laji on paremmin sopeutunut pohjoisen Itämeren ympäristöoloihin. Eteläisen Itämeren epäsuotuisammat ja mahdollisesti vaihtelevammat ympäristöolot saattavat ylläpitää populaatiossa suurempaa geneettistä vaihtelua. Kunnon johtopäätösten vetämiseksi olisi kuitenkin kerättävä molemmilta merialueilta suurempi ja laadukkaampi aineisto.

AMOVA:n mukaan valtaosa aineistossa havaittavista geneettisistä eroista on yksilöiden välillä (90 % vaihtelusta näytepisteen sisällä), mutta eroa on jonkin verran myös näytepisteiden välillä (10 % vaihtelusta). Tämä ero on pääosin etelän ja pohjoisen näytepisteiden välillä, sillä merialueiden sisäiset parittaiset erot olivat hyvin pieniä (Suomenlahden asemien välillä ei merkitsevää eroa, eteläisen Itämeren asemien välinen  $F_{ST}$  vain 0,05).

Populaatioiden pienet parittaiset  $F_{ST}$ -arvot, eli pienet geneettiset erot populaatioiden välillä, ovat tyypillisiä mereisille lajeille, jotka levittäytyvät uusille alueille merivirtojen mukana (Palumpi 2003). Esimerkiksi amerikankampamaneettien luontaisten Woods Holen ja Galveston Bayn populaatioiden välinen  $F_{ST}$ -arvo on vain 0.268, vaikka välimatkaa merta pitkin on yli 3 000 kilometriä (Reusch ym. 2010). Colson & Hughes (2004) taulukoivat kirjallisuudessa esiteltyjä  $F_{ST}$ -arvoja ja lajin toukkien leviämiskykyä. Oman aineistoni  $F_{ST}$ -arvot (etelän ja pohjoisen asemien välinen parittainen vaihtelu:  $F_{ST}$  0,11–0,17; merialueiden välinen parittainen vaihtelu:  $F_{ST}$  0,12) ovat samansuuntaisia kuin heidän listaamiensa planktisen toukkamuodon omaavien eläinten ( $F_{ST}$  0,00–0,14, välimatkan suuruusluokka 1000 km). Aineistoni arvot ovat kuitenkin tämän skaalan yläpäästä,

vaikka näytepisteiden välinen ero on skaalan alapäässä (korkeintaan noin 700 km).<sup>3</sup> Tässä esittämälläni vertailuaineiston pohjalta voin sanoa, että arktisen kampamaneetin Itämeren populaatioiden väliset geneettiset erot ovat melko samansuuntaisia kuin leviämispotentiaaliltaan samanlaisten lajien. Näyttää siltä, että erot saattaisivat olla hiukan odotettua suurempia, mikä sopisi osittain itsesiitoksella lisääntyvälle eläimelle, mutta tämän varmistamiseksi lisätutkimus on tarpeen.

Aineistossani saman merialueen populaatiot ovat geneettisesti lähellä toisiaan ja kahden eri merialueen populaatiot eroavat toisistaan selvästi. Hypoteesini mukaisesti Itämeren populaatioiden geneettinen rakenne näyttää sopivan IBD-malliin. Valitettavasti aineistoni on niin pieni, ettei etäisyyksien ja geneettisten erojen korrelaatiosta saa tilastollisesti merkitsevää tulosta, vaikka se onkin silmämääräisesti selkeä. Suuremmalla näytepisteiden määrällä myös tilastollinen merkitsevyys todennäköisesti saavutettaisiin, mutta toki tämä pitäisi vielä varmistaa käytännössä. Myös Structuren tarjoama populaatorakenne sopii IBD-teoriaan: ohjelman mukaan aineistoni on jakautunut kahteen populaatioon, eteläiseen ja pohjoiseen. Jos aineistossani olisi ollut näytteitä tasaisemmin koko Itämeren alueelta, olisi analyyseissä todennäköisesti nähtävissä pohjoisen populaation hidas muuttuminen etelän populaatioksi. Structure Harvesterin antamasta pylväsdiagrammista näkyy nytkin selvästi, että populaatioiden välillä on geenivirtaa.

Rakensin aineiston pohjalta myös UPGMA-puun, josta on havaittavissa sama populaatorakenne kuin Structuren tuloksista, mutta heikoin bootstrap-arvoin. Puun haarojen saama heikko tuki johtunee nimenomaan eri alueiden välisestä geenivirrasta: edes pohjoisen ja etelän populaatioiden välinen jako ei ole kovin vahva. Tämä näkyy puussa myös niin, että vaikka eri alueiden yksilöt pääasiassa eroavat omiin haaroihinsa, muutama yksittäinen yksilö asettuu väärän merialueen yksilöiden joukkoon (BCS:n yksilö 10, Stolpen yksilöt 4 ja 6 sekä LL7:n yksilöt 2 ja 7).

---

<sup>3</sup> Reusch ja muut (2010) käyttivät menetelmänä mikrosatelliitteja ja Colsonin ja Hughesin (2004) vertailutaulukossa on lähinnä mikrosatelliitti- ja allotsyymipohjaisia arvoja. AFLP-pohjaisten  $F_{ST}$ -arvojen vertailukelpoisuudesta muilla (kodominateilla) menetelmillä saatujen arvojen kanssa ei ole vielä tarpeeksi tutkimustuloksia. Vaikka (Nybom 2004) on osoittanut, että AFLP-pohjaiset arvot ovat pääasiassa samansuuruisia kuin muilla menetelmillä saadut, ovat ne joidenkin arvioiden mukaan joko merkittävästi korkeampia (Mock ym. 2002) tai merkittävästi matalampia (Yang ym. 1999) kuin muilla menetelmillä saadut arvot. Koska AFLP:tä on käytetty eläimillä verrattain vähän (Bensch & Åkerson 2005), ja planktisilla merieläimillä vielä vähemmän, ei kirjallisuudesta kuitenkaan löydy tällä menetelmällä saatuja kelpollisia vertailuarvoja, vaan tyydyn tässä esitettyihin.

## 5 Loppuyhteenvedo ja tulevaisuuden tutkimuskohteita

Ekologisessa tutkimuksessa oikeanlaiset näytteenottomenetelmät ovat tärkeitä. Jos menetelmiä ei valita huolella ja kaikille lajeille sopiviksi, saattaa yleinenkin laji jäädä huomioimatta lajistokartoituksissa. Näin on käynyt Itämerellä kampamaneettien kohdalla viime vuosikymmenten aikana. Laadukkaan näytteenoton lisäksi myös luotettava lajintunnistus on tärkeää, ja sen pitäisi olla kaiken ekologisen tutkimuksen perusta. Tämä opinnäytetyö yhdessä aiemman tutkimuksen kanssa (Gorokhova ym. 2009) osoittaa, ettei amerikankampamaneetti ole levinnyt pohjoiselle Itämerelle, vaikka niin suurieleisesti jo ehdittiin raportoida (Lehtiniemi ym. 2007). Alueella ei myöskään elä pikkumaneettia, vaikka sitä on pidetty Itämeren lajina yli vuosisadan ajan (Levander 1901). Tämän tason virheitä lajintunnistuksessa ei saisi missään nimessä tapahtua. Kampamaneetteja käsittelevässä kirjallisuudessa ylipäätään, ei vain Itämerellä, mainitaan hyvin harvoin kuinka laji on määritetty, vaikka alueella eläisi useampaa kampamaneettilajia. Pelkään, että usein lajinmääritys jääkin vain oletuksen tasolle. Vain harvoissa artikkeleissa (esimerkiksi Purcell ym. 2010) edes mainitaan, ettei pieniä yksilöitä ollut mahdollista tunnistaa lajilleen.

Kampamaneettien kohdalla kannattaa tulevaisuudessa panostaa yhä enemmän molekyylibiologisiin menetelmiin niin lajintunnistuksessa kuin populaatiobiologiassakin. Populaatiogenetiikan tutkimusmenetelmänä esimerkiksi AFLP näyttäisi toimivan hyvin tällä pääjaksolla. Menetelmällä on laajat sovellusmahdollisuudet aina populaation sisäisen ja eri populaatioiden välisen geneettisen vaihtelun tutkimuksesta fylogenioiden rakentamiseen asti (Bensch & Åkerson 2005). Mielestäni arktisen kampamaneetin lajistatuksen varmistaminen ja sen maailmanlaajuisen populaatiogenetiikan tarkastelu olisivat erinomainen lähtökohta koko pääjakson tutkimuksen siirtämiselle nykyaikaan.

Myös kampamaneettien perusekologian tuntemuksessa on edelleen suuria aukkoja. Esimerkiksi arktisen kampamaneetin pienten yksilöiden ekologiasta ei tiedetä vielä juuri mitään, vaikka laji on yksi tutkituimmista kampamaneettilajeista. Tällä hetkellä ei tiedetä edes, mitä pienet yksilöt käyttävät ravinnokseen Arktiksella, saati Itämerellä. Myös lisääntymisstrategioiden tarkempaa tutkimusta kaivataan kipeästi. Kun arktisen kampamaneetin Itämeren ja Arktiksen populaatioiden välinen geneettinen suhde saadaan selvitettyä, olisi myös äärimmäisen mielenkiintoista verrata eri populaatioiden ekologian eroja suhteessa niiden geneettisiin eroihin.

Myös kampamaneettien merkitys Itämeren ekosysteemissä kaipaa kipeästi lisäselvityksiä. Lajin paikka ravintoverkossa on tuntematon ja sen vuodenaikainen populaatiodynamiikka on varsinkin merialueen pohjoisosissa vielä selvittämättä. Tässä opinnäytetyössä olen osoittanut arktisen

kampamaneetin olevan laajalle levinnyt ja runsaslukuinen, jolloin sen vaikutus koko Itämeren alueella on väistämättä merkittävä.

## **6 Kiitokset**

Baltic Zooplankton Cascades (BAZOOCA) –projektille ja Suomen ympäristökeskuksen (SYKE) vieraslajiprojektille rahoituksesta. Helsingin yliopiston molekyyliökologian ja systematiikan laboriolle sekä Tvärminnen eläintieteelliselle asemalle. Walter ja Andrée de Nottbeckin säätiölle ja Biologian seura Vanamolalle työskentelystipendeistä sekä Helsingin yliopistolle Gradu valmiiksi –stipendistä, jonka turvin todella sain tämän opinnäytteen valmiiksi.

Ohjaajilleni Jaanika Blomsterille, Maiju Lehtiniemelle ja Pia Mäenpää-Tahvanaiselle kolmen vuoden kärsivällisyydestä. Hanna Peltoselle, Tarja Katajistolle ja Outi Setälälle avusta ja yhteistyöstä kentällä ja laboratoriossa. Sanna Majanevalle korvaamattomasta henkisestä tuesta. Jani Anttilalle ja Veli-Matti Parpalalle kultaakin kalliimmista tilastoneuvoista. Tuomas Kankaanpäälle viitteidenhallinta-avusta. Hanna Kaukolle avusta ruosteisen saksani kanssa. Olavi Hakalalle, joka potki minuun vauhtia aineiston analysointivaiheessa. Markku Hakalalle, joka piti huolta edellä mainitusta viimeistellessäni tekstiä, ja joka oli muutenkin läsnä ja tukena koko työn ajan.

Ja ennen kaikkea niille 4329 kampamaneettityksilölle, jotka menettivät henkensä tämän opinnäytetyön vuoksi.

## 7 Läheteet

- Ackefors, H. 1969: Ecological zooplankton investigations in the Baltic proper 1963–1965 — Institute of Marine Research of Lysekil, Series of Biological Reports 18: 1–139.
- Acuña, J. L., Lopez-Urrutia, A. & Colin, S. P. 2011: Faking Giants: The evolution of high prey clearance rates in jellyfish — *Science* 333: 1627–1629.
- Alheit, J., Mollmann, C., Dutz, J., Kornilovs, G., Loewe, P., Mohrholz, V. & Wasmund, N. 2005: Synchronous ecological regime shifts in the central Baltic and the North Sea in the late 1980s — *ICES Journal of Marine Science* 62: 1205–1215.
- Amar, K.-O., Douek, J., Rabinowitz, C. & Rinkevich, B. 2008: Employing of the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Methodology as an Efficient Population Genetic Tool for Symbiotic Cnidarians — *Marine Biotechnology* 10: 350–357.
- Arnheim, N. 1992: Polymerase chain reaction strategy — *Annu. Rev. Biochem* 61: 131–156.
- Avice, J. C. & Wollenberg, K. 1997: Phylogenetics and the origin of species — *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 94: 7748–7755.
- Avice, J. C. 1989: Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology — *Evolution* 43(6): 1192–1208.
- Baldwin, B. G. 1992: Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae — *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1(1): 3–16.
- Barber, H. P., Palumbi, S. R., Erdmann, M. V. & Moosa, M. K. 2002: Sharp genetic breaks among populations of *Haptosquilla pulchella* (Stomatopoda) indicate limits to larval transport: patterns, causes, and consequences — *Molecular Ecology* 11: 659–674.
- Barrière, A. & Félix, M.-A. 2005: High local genetic diversity and low outcrossing rate in *Caenorhabditis elegans* natural populations — *Current Biology* 15: 1176–1184.
- Benjak, A., Konrad, J., Blaich, R. & Forneck, A. 2006: Different DNA extraction methods can cause different AFLP profiles in grapevine (*Vitis vinifera* L.) — *Vitis* 45(1): 15–21.
- Bensch, S. & Åkerson, M. 2005: Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? — *Molecular ecology* 14: 2899–2914.
- Benzie, J. A. H. 1999: Major genetic differences between crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) populations in the Indian and Pacific Ocean — *Evolution* 53: 1782–1795.
- Bonin, A., Bellemain, E., Bronken Eidesen, P., Pompanon, F., Brochmann, C. & Taberlet, P. 2004: How to track and assess genotyping errors in population genetics studies — *Molecular Ecology* 13: 3261–3273.
- Brenner, S. 1974: The Genetics of *Caenorhabditis elegans* — *Genetics* 77(1): 71–94.
- Charlesworth, D. & Wright, S. I. 2001: Breeding systems and genome evolution — *Current opinion in genetics & development* 11: 685–690.
- Chen, F., Luo, X., Wang, D. & Ke, C. 2010: Population structure of the spotted babylon, *Babylonia areolata* in three wild populations along the Chinese coastline revealed using AFLP fingerprinting — *Biochemical systematics and ecology* 38:1103–1110.
- Collins, A. G. 1998: Evaluating multiple alternative hypotheses for the origin of Bilateria: An analysis of 18S rRNA molecular evidence — *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 95: 15458–63.
- Colson, I. & Hughes, R. N. 2004: Rapid recovery of genetic diversity of dogwhelk (*Nucella lapillus* L.) populations after local extinction and recolonization contradicts predictions from life-history characteristics — *Molecular ecology* 13(8): 2223–2233.
- Condon, R. H., Graham, W. M., Duarte, C. M., Pitt, K. A., Lucas, C. H., Haddock, S. H. D., Sutherland, K. R., Robinson, K. L., Dawson, M. N., Decker, M., Mills, C. E., Purcell, J. E., Malej, A., Mianzan, H., Uye, S.-I., Gelcich, S. & Madin, L. P. 2012: Questioning the rise of gelatinous zooplankton in the World's Oceans — *Bioscience* 62: 160–169.
- Darwin, C. 1876: *The Effects of Cross and Self-Fertilization in the Vegetable Kingdom*. London, Murray s.



- Davis, C. C. & Williams, R. H. 1950: Brackish water plankton of mangrove areas in southern Florida — *Ecology* 31(4): 519–531.
- Dawson, M. N. & Jacobs, D. K. 2001: Molecular Evidence for Cryptic Species of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa) — *The Biological Bulletin* 200: 92–96.
- Dinasquet, J., Granhag, L. & Riemann, L. 2012: Stimulated bacterioplankton growth and selection for certain bacterial taxa in the vicinity of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* — *Front Microbiol* 3(302).
- Dumont, H. J. 1994: The distribution and ecology of the fresh- and brackish-water medusae of the world — *Hydrobiologia* 272: 1–12.
- Dunn, C. W., Hejnol, A., Matus, D. Q., Pang, K., Browne, W. E., Smith, S. A., Seaver, E., Rouse, G. W., Obst, M., Edgecombe, G. D., Sorensen, M. V., Haddock, S. H. D., Schmidt-Rhaesa, A., Okusu, A. & Kristens 2008: Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life — *Nature* 452(7188): 745–749.
- Dyer, A. T. & Leonard, K. J. 2000: Contamination, error, and nonspecific molecular tools — *Phytopathology* 90: 565–567.
- Earl, D. & vonHoldt, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method, 2011. Saatavilla: [http://taylor0.biology.ucla.edu/struct\\_harvest/](http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/).
- Eernisse, D. J., Albert, J. S. & Anderson, F. E. 1992: Annelida and Arthropoda are not sister taxa: a phylogenetic analysis of spiralian metazoan phylogeny — *Systematic Biology* 41: 305–30.
- Efron, B. 1979: Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife — *The Annals of Statistics* 7(1): 1–26.
- Ehrich, D. 2006: AFLPdat: a collection of R functions for convenient handling of AFLP data — *Molecular Ecology Notes* 6: 603–604.
- Elphinstone, M. S., Hinten, G. N., Anderson, M. J. & Nock, C. J. 2003: An inexpensive and high-throughput procedure to extract and purify total genomic DNA for population studies — *Molecular Ecology Notes* 3: 317–320.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. 2005: Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study — *Molecular Ecology* 14(8): 2611–2620.
- Excoffier, L. & Lischer, H. E. L. 2010: Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows — *Molecular Ecology Resources* 10(3): 564–567.
- Falk-Petersen, S., Dahl, T. M., Scott, C. L., Sargent, J. R., Gulliksen, B., Kwasniewski, S., Hop, H. & R-M, M. 2002: Lipid Biomarkers and trophic linkages between ctenophores and copepods in Svalbard waters — *Marine ecology progress series* 227: 187–194.
- Furman, Dahlström & Hamari 1998: *Itämeri - luonto ja ihminen* — Otava, Keuruu.
- Gardes, M., White, T. J., Fortin, J. A., Bruns, T. D. & Taylor, J. W. 1991: Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA — *Canadian Journal of Botany* 69: 180–190.
- Gorokhova, E. & Lehtiniemi, M. 2010: Reconsidering evidence for *Mnemiopsis* — *Journal of Plankton Research* 32(1): 93–95.
- Gorokhova, E., Lehtiniemi, M., Viitasalo-Frösen, S. & Haddock, S. H. D. 2009: Molecular evidence for the occurrence of ctenophore *Mertensia ovum* in the northern — *Limnology and Oceanography* 54(6): 2025–2033.
- Graham, W. M., Martin, D. L. & Martin, J. C. 2003: In situ quantification and analysis of large jellyfish using a novel video profiler — *Marine Ecology Progress Series* 254: 129–140.
- Graham, W. M., Pagès, F. & Hamner, W. M. 2001: A physical context for gelatinous zooplankton aggregations: a review — *Hydrobiologia* 451: 199–212.
- Greve 1975: Ctenophore — *Fiches d'identification du zooplancton* 146: 6.
- Greve, W. & Reiners, F. 1988: Plankton time-space dynamics in German Bight - a systems approach — *Oecologia* 77: 487–496.
- Haddock, S. H. D. & Case, J. F. 1995: Not all ctenophores are bioluminescent: *Pleurobrachia* — *The Biological Bulletin* 189: 356–362.

- Hamner, W. M., Madin, L. P., Alldredge, A. L., Gilmer, R. W. & Hamner, P. P. 1975: Underwater observations of gelatinous zooplankton - Sampling problems, feeding biology, and behavior — *Limnology and Oceanography* 20: 907–917.
- Hansson, H. G. 2006: Ctenophores of the Baltic and adjacent Seas – the invader *Mnemiopsis leidyi* is here! — *Aquatic Invasions* 1(4): 295–298.
- Harbison, G. R. & Miller, R. L. 1986: Not all ctenophores are hermaphrodites. Studies on the systematics, distribution, sexuality and development of two species of *Ocyropsis* — *Marine Biology* 90: 413–424.
- Harbison, G. R. 1982: On the classification and evolution of the Ctenophora, *The Origins and Relationships of Lower Invertebrates*: sivut 78–100. Systematics Association, Oxford
- Harbison, G. R. 1985: On the classification and evolution of the Ctenophora — Systematics Association Special Volume Series: 78–100.
- Harbison, G. R. The potential of fishes for the control of gelatinous zooplankton. Committee Meeting of International Council for Exploration of the Sea (ICES). 1993.
- Harbison, G. R., Madin, I. P. & Swanberg, N. R. 1978: On the natural history and distribution of oceanic ctenophores — *Deep-Sea Research* 25: 233–256.
- Harrison, N. M. 1984: Predation on jellyfish and their associates by seabirds — *Limnology and Oceanography* 29: 1335–1337.
- Hellberg, M. E., Burton, R. S., Neigel, J. E. & Palumbi, S. R. 1994: Genetic assesment of connectivity among marine populations — *Bulletin of marine science* 70(1): suppl. 273–290.
- Hernroth, L. & Ackefors, H. 1979: The zooplankton of the Baltic proper — *Inst Mar Res Rep* 2: 1–60.
- Hillebrandt, M. Untersuchungen über die qualitative und quantitative Zusammensetzung des Zooplanktons in der Kieler Bucht während der Jahre 1966–1968. Kielin yliopisto. 1972.
- Hirche, K. & Barz, H.-J. 2005: Seasonal development of scyphozoan medusae and the predatory impact of *Aurelia aurita* on the zooplankton community in the Bornholm Basin (central Baltic Sea) — *Marine Biology* 147: 465–476.
- Hirota, J. 1972: Laboratory culture and metabolism of the planktonic ctenophore, *Pleurobrachia bachei*. — Kirjassa: Takenouti, A. Y. (Toim.), *Biological oceanography of the North Pacific*: sivut 465–484. Idemitsu-Shoten, Tokio, Japani
- Hirota, J. 1974: Quantitative natural history of *Pleurobrachia bachei* (A. Agassiz) in la Jolla bight — *Fishery Bulletin* 72: 295–335.
- Hopcroft, R. R. & Roff, J. C. 1998: Production of tropical larvaceans in Kingston Harbour, Jamaica: are we ignoring an important secondary producer? — *Journal of Plankton Research* 20: 557–569.
- Hyman, L. H. 1940: *The Invertebrates: Protozoa through Ctenophora* — McGraw-Hill. New York
- ITIS-organisaatio 2009- : Integrated Taxonomic Information System online database. Saatavilla: <http://www.itis.gov>. Luettu: Heinäkuu 2012.
- Jaspers, C., Haraldsson, M., Lombard, F., Bolte, S. & Kiørboe, T. 2012 b: Seasonality of ctenophore larvae in the Baltic — jätetty julkaistavaksi.
- Jaspers, C., M, H., Bolte, S., Reusch, T. B. H., Thygesen, U. H. & Kiørboe, T. 2012 a: Ctenophore population recruits entirely through larval reproduction in the central Baltic Sea — *Biology letters* 8(5): 809–812.
- Jaspers, C., Møller, L. F. & Kiørboe, T. 2011: Salinity gradient of the Baltic Sea limits the reproduction and population expansion of the newly invaded comb jelly *Mnemiopsis leidyi*. *PLOS ONE* 6(8): e24065.
- Javidpour, J., Molinero, J. C., Lehmann, A., Hansen, T. & Sommer, U. 2009 b: Annual assessment of the predation of *Mnemiopsis leidyi* in a new invaded environment, the Kiel Fjord (Western Baltic Sea): a matter of concern? — *Journal of Plankton Research* 31(7): 729–738.
- Javidpour, J., Molinero, J. C., Peschutter, J. & Sommer, U. 2009 a: Seasonal changes and population dynamics of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* after its first year of invasion in the Kiel Fjord, Western Baltic Sea — *Biological Invasions* 11(4): 873–882.
- Javidpour, J., Sommer, U. & Shiganova, T. 2006: First record of *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz 1865 in the Baltic Sea — *Aquatic Invasions* 1(4): 299–302.
- Kautsky, N. & Tedengren, M. 1992: Ecophysiological strategies in Baltic Sea invertebrates, *Proceedings of 12th Baltic Marine Biologists Symposium 25–30 August 1991*: sivut. 91–96. Olsen & Olsen, Helsingør, Tanska

- Kim, J., Kim, W. & Cunningham, C. W. 1999: A new perspective on lower metazoan relationships from 18S rDNA sequences — *Molecular Biology and Evolution* 16: 423–27.
- Kliman, R. M., Andolfatto, P., Coyne, J. A., Depaulis, F., Kreitman, M., Berry, A. J., McCarter, J., Wakeley, J. & Hey, J. 2000: The Population Genetics of the Origin and Divergence of the *Drosophila simulans* Complex Species — *Genetics* 156(4): 1913–1931.
- Knowlton, N. 2000: Molecular genetic analyses of species boundaries — *Hydrobiologia* 420: 73–90.
- Koch, R., van Luenen, H. G. A. M., van der Horst, M., Thijssen, K. L. & Plasterk, R. H. A. 2000: Single nucleotide polymorphisms in wild isolates of *Caenorhabditis elegans* — *Genome Research* 10: 1690–1696.
- Kohn, A. B., Citarella, M. R., Kocot, K. M., Bobkova, Y. V., Halanych, K. M. & Moroz, L. L. 2012: Rapid evolution of the compact and unusual mitochondrial genome in the ctenophore, *Pleurobrachia bachei* — *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63(1): 203–207.
- Kong, L. & Li, Q. 2009: Genetic evidence for the existence of cryptic species in an endangered clam *Coelomactra antiquata* — *Marine biology* 156: 1507–1515.
- Korbie, D. J. & Mattick, J. S. 2008: Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification — *Nature Protocols* 3: 1452–1456.
- Kremer, P. & Nixon, S. 1976: Distribution and abundance of ctenophore *Mnemiopsis leidyi* in Narragansett bay — *Estuarine, Coastal and Marine Science*. 4: 627–639.
- Krumbach, T. 1926: *Ctenophora, Die Tierwelt der nord- und Ostsee*: sivut 1-50. Akademische Verlagsgesellschaft Becker & Erler, Leipzig
- Kändler, R. 1961: über das Vorkommen von Fischbrut, Dekapodenlarven und Medusen in der Kieler Förde — *Kieler Meeresforsch* 17: 48–64.
- Lehtiniemi, M., Pääkkönen, J.-P., Flinkman, J., Katajisto, T., Gorokhova, E., Karjalainen, M., Viitasalo, S. & Björk, H. 2007: Distribution and abundance of the American comb jelly (*Mnemiopsis leidyi*) – A rapid invasion to the northern Baltic Sea during 2007 — *Aquatic Invasions* 2(4): 445–449.
- Lenz, J. 1973: On the occurrence of the ctenophore *Bolinopsis infundibulum* (O. F. Müller) in the Western Baltic — *Journal du Conseil international pour l'exploration de la mer* 35(1): 32–35.
- Leppäkoski, E. & Olenin, S. 2000: Non-native species and rates of spread: lessons from the brackish Baltic Sea — *Biological Invasions* 2: 151–163.
- Leppäkoski, E., Gollasch, S., Gruszka, P., Ojaveer, H., Olenin, S. & Panov, V. 2002: The Baltic—a sea of invaders — *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* 59: 1175–1188.
- Levander, K. M. 1901: Om *Pleurobrachia pileus* — *Meddelanden af societetas pro fauna et flora fennica* 27: 42–43.
- Lindquist, A. 1958: Über das Vorkommen von *Pleurobrachia pileus* (O.F. Muller) (Ctenophora) in den nördlichen Teilen der Ostsee — *Commentationes biologicae* 17(2).
- Liu, J.-Y., Lun, Z.-R., J-B, Z. & T-B, Y. 2009: Population genetic structure of striped mullet, *Mugil cephalus*, along the coast of China, inferred by AFLP fingerprinting — *Biochemical Systematics and Ecology* 37: 266–274.
- Lowe, A., Harris, S. & Ashton, P. 2004: *Ecological Genetics - Design, Analysis, and Application* — Blackwell Publishing.
- Lundberg, M., Hop, H., Eiane, K., Gulliksen, B. & Falk-Petersen, S. 2006: Population structure and accumulation of lipids in the ctenophore *Mertensia ovum* — *Marine Biology* 149(6): 1345–1353.
- Maddison, D. R. & Schulz, K.-S. 2007- : The Tree of Life Web Project. Saatavilla: <http://tolweb.org>. Luettu heinäkuussa 2012.
- Martindale, M. Q. & Henry, J. Q. 1998: The development of radia and biradial symmetry: The evolution of bilaterality — *American Zoologist* 38: 672–684.
- Martindale, M. Q. 1987: Larval reproduction in the ctenophore *Mnemiopsis mccradyi* (order Lobata) — *Marine Biology* 94: 409–414.
- Matsumoto, G. I. & Harbison, G. R. 1993: In situ observations of foraging, feeding, and escape behavior in three orders of oceanic ctenophores: Lobata, Cestida, and Beroida — *Marine biology* 117: 279–287.
- Mayer, A. G. 1912: *Ctenophores of the Atlantic coast of North America* — Carnegie Institution of Washington. 55 s.

- Medina, M., Collins, A. G., Silberman, J. D. & Sogin, M. L. 2001: Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA — *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 98: 9707–12.
- Mianzan, H. W., Mari, N., Brenski, P. & Sanchez, F. 1996: Fish predation on neritic ctenophores from the Argentine continental shelf: A neglected food resource? — *Fisheries Research* 27: 69–79.
- Mielck, W. & Künne, C. 1935: Fischbrut. und Plankton-Untersuchungen auf dem Reichsforschungsdampfer "Poseidon" in der Ostsee, Mai-Juni 1931 — *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresunters* 19: 1–119.
- Mielck, W. 1926: Die Verbreitung der grösseren Planktontiere in der Ostsee April 1925 — *Berichte der Deutschen Wissenschaftlichen Kommission für Meeresforschung* 2(4): 299–303.
- Mills, C. E. 1998- : Phylum Ctenophora: list of all valid species names. Elektroninen internetdokumentti. Saataavilla: <http://faculty.washington.edu/cemills/Ctenolist.html>. Luettu heinäkuussa 2012.
- Mock, K. E., Theimer, T. C., Rhodes, O. E., Greenberg, D. L. & Keim, P. 2002: Genetic variation across the historical range of the wild turkey (*Meleagris gallopavo*) — *Molecular ecology* 11: 643–657.
- Moon-van der Staay, S. Y., De Wachter, R. & Vault, D. 2001: Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity — *Nature* 409: 607–610.
- Mortensen, T. 1912: Ctenophora — *The Danish Ingolf-Expedition* 5: 1–95.
- Nei, M. & Li, W.-H. 1979: Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases — *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*(76): 5269–5273.
- Nei, M. 1987: *Molecular evolutionary genetics* — Columbia University Press. New York
- Niermann, U., Bingel, F. & Ergün, G. 1998: Fluctuation of dominant mesozooplankton species in the Black Sea, North Sea and the Baltic Sea: Is a general trend recognisable? — *Türk Zooloji Dergisi* 22: 63–81.
- Nybom, H. 2004: Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants — *Molecular Ecology* 13: 1143–1155.
- Oliveira, O. M. 2007: The presence of the Ctenophore *Mnemiopsis leidyi* in the Oslofjorden and considerations on the initial invasion pathway to the North and Baltic Sea — *Aquatic Invasions* 2: 185–189.
- Oviatt, C. A. & Kremer, P. M. 1977: Predation on the ctenophore, *Mnemiopsis leidyi*, by butterfish, *Peprilus triacanthus*, in Narragansett Bay, Rhode Island — *Chesapeake Science* 18: 236–240.
- Paavola, M., Olenin, S. & Leppakoski, E. 2005: Are invasive species most successful in habitats of low native species richness across European brackish water seas? — *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 64: 738–750.
- Palumbi, S. R. 1994: Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation — *Annual Review of Ecology and Systematics* 25: 547–572.
- Palumbi, S. R. 1994: Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation.. — *Annual Review of Ecology and Systematics* 25: 547–572.
- Palumpi, S. R. 2003: Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves — *Ecological Applications* 13(1): Supplementti 145–158.
- Percy, J. A. & Fife, F. J. 1981: The biochemical composition and energy content of arctic marine macrozooplankton — *Arctic* 34: 307–313.
- Percy, J. A. 1989: Abundance, Biomass and size frequency distribution of an arctic ctenophore, *Mertensia ovum* (Fabricius) from Frobisher bay, Canada — *Sarsia* 74: 95–105.
- Peterson, K. J. & Eernisse, D. J. 2001: Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA gene sequences — *Evolution & Development* 3: 170–205.
- Pett, W., Ryan, J. F., Pang, K., Mullikin, J. C., Martindale, M. Q., Baxevanis, A. D. & Lavrov, D. V. 2011: Extreme mitochondrial evolution in the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*: Insight from mtDNA and the nuclear genome — *Mitochondrial DNA* 22(4): 130–142.
- Pianka, H. 1974: Ctenophora, *Reproduction of marine invertebrates*: sivut 201–265. Academic, New York
- Podar, M., Haddock, S. H. D., Sogin, M. L. & Harbison, G. R. 2001: A molecular phylogenetic framework for phylum ctenophora using 18S rRNA genes — *Molecular phylogenetics and evolution* 21(2): 218–230.
- Pritchard, K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data — *Genetics* 155(2): 945–959.

- Purcell, J. E. 1991: A review of cnidarians and ctenophores feeding on competitors in the plankton — *Hydrobiologia* 216/217: 335–342.
- Purcell, J. E., Hopcroft, R. R., Kosobokova, K. N. & Whitley, T. E. 2010: Distribution, abundance, and predation effects of epipelagic ctenophores and jellyfish in the western Arctic Ocean — *Deep-Sea Research II* 57: 127–135.
- Qiagen 2006: *DNeasy® Blood & Tissue Handbook*
- Raskoff, K. A. H. R., Kosobokova, K. N., Purcell, J. E. & Youngbluth, M. 2010: Jellies underice: ROV observations from the Arctic 2005 hidden ocean expedition — *Deep-Sea Research II* 57: 111–126.
- Raskoff, K. A., Purcell, J. E. & Hopcroft, R. R. 2005: Gelatinous zooplankton of the Arctic Ocean: in situ observations under the ice — *Polar biology* 28: 207–217.
- RDevelopmentCoreTeam. R: A Language and Environment for Statistical Computing, 2011. Saatavilla: <http://www.R-project.org>.
- Reeve, M. R., Walter, M. A. & Ikeda, T. 1978: Laboratory studies of ingestion and food utilization in lobate and tentaculate ctenophores — *Limnology and Oceanography* 23: 740–751.
- Reusch, T. B. H., Bolte, S., Sparwel, M. M. A. G. & Javidpour, J. 2010: Microsatellites reveal origin and genetic diversity of Eurasian invasions by one of the world's most notorious marine invader, *Mnemiopsis leidyi* (Ctenophora) — *Molecular Ecology* 19: 2690–2699.
- Richardson, A. J., A. B., Hays, G. C. & Gibbons, M. J. 2009: The jellyfish joyride: causes, consequences and management responses to a more gelatinous future — *Trends in Ecology & Evolution* 24: 312–322.
- Roberts, C. M. 1997: Connectivity and Management of Caribbean Coral Reefs — *Science* 278: 1454–1457.
- Roughgarden, J., Iwasa, Y. & Baxter, C. 1985: Demographic theory for an open marine population with space-limited recruitment — *Ecology* 66(1): 54–67.
- Rowe, M. D. Some aspects of the feeding behavior of the ctenophore *Pleurobrachia pileus*. Hawaiiin yliopisto. Honolulu, Hawaii, 1971.
- Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S. C. & ym. 2001: A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms — *Nature* 409: 928–933.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. 1985: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia — *Science* 230(4732): 1350–1354.
- Sandstrom, O. 1982: The plankton fauna of the gulf of Bothnia, *Coastal Research in the Gulf of Bothnia, Monographiae Biologicae* 45: 173–196
- Schmidt-Nielsen, K. 1984: *Scaling: why is animal size so important?* — Cambridge University Press. Cambridge
- Schram, F. R. 1991: Cladistic analysis of metazoan phyla and the placement of fossil problematica, *Early Evolution of Metazoa and the Significance of Problematic Taxa*: pp. 35–46. Cambridge University Press, New York
- Scneider, G. 1987: Role of advection in the distribution and abundance of *Pleurobrachia pileus* in Kiel Bight — *Marine Ecology* 41: 9–102.
- Shiganova, T. A., Mirzoyan, Z. A., Studenikina, E., Volovik, S. P., Siokou-Frangou, I., Zervoudaki, S., Christou, E. D., Skirta, A. Y. & Dumont, H. J. 2001: Population development of the invader ctenophore *Mnemiopsis leidyi*, in the Black Sea and in other seas of the Mediterranean basin — *Marine Biology* 139: 431–445.
- Siferd, T. D. & Conover, R. J. 1992: Natural history of ctenophores in the Resolute Passage area of the Canadian High Arctic with the special reference to *Mertensia ovum* — *Marine Ecology Progress Series* 86(2): 133–144.
- Sivasundar, A. & Hey, J. 2003: Population genetics of *Caenorhabditis elegans*: the paradox of low polymorphism in a widespread species — *Genetics* 163: 147–157.
- Sokal, R. R. & Michener, C. D. 1958: A statistical method for evaluating systematic relationships — *University of Kansas Science Bulletin* 38: 1409–1438.
- Stearns, S. C. 1992: *The evolution of life histories, 1st edn* — Oxford University Press. Oxford, UK
- Sullivan, L. J. & Gifford, D. J. 2004: Diet of the larval ctenophore *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz (Ctenophora, Lobata) — *Journal of Plankton Research* 26(4): 417–431.

- Swanberg, N. & Båmstedt, U. 1991: Ctenophora in the Arctic: the abundance, distribution and predatory impact of the cydippid ctenophore *Mertensia ovum* (Fabricius) in the Barents Sea — *Polar research* 10(2): 507–524.
- Tendal, O. S., Jensen, K. R. & Riisgaard, H. U. 2007: Invasive ctenophore *Mnemiopsis leidyi* widely distributed in Danish waters — *Aquatic Invasions* 2: 455–460.
- Wallberg, A., Tholleson, M., Farris, J. S. & Jondelius, U. 2004: The phylogenetic position of the comb jellies (Ctenophora) and the importance of taxonomic sampling — *Cladistics* 20: 558–578.
- Van de Peer, Y. & De Wachter, R. 1994: TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment — *Computer Applications in the Biosciences* 10(5): 569–570.
- van der Veer, H. W. & Sadee, C. F. M. 1984: Seasonal occurrence of the ctenophore *Pleurobrachia pileus* in the western Dutch Wadden Sea — *Marine Biology* 79: 219–228.
- Ward, R. D., Woodward, M. & Skibinski, D. O. F. 1994: A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes — *Journal of Fish Biology* 44: 213–232.
- Whitlock, R., Hipperson, H., Mannarelli, M., Butlin, R. K. & Burke, T. 2008: An objective, rapid and reproducible method for scoring AFLP peak-height data that minimizes genotyping error — *Molecular Ecology Resources* 8(4): 725–735.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. 1979: Preparative and analytical purification of DNA from agarose — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 615.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van der Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting — *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407–4414.
- Wright, S. 1943: Isolation by distance — *Genetics* 28: 139–156.
- Vuorinen, I. & Vihersaari, S. 1989: Distribution and abundance of *Pleurobrachia pileus* (Ctenophora) in the Baltic Sea — *Memoranda Societatis pro Fauna et Flora Fennica* 65: 129–131.
- Vuorinen, I. 1987: Is the ctenophore *Pleurobrachia pileus* important in the ecosystem of the Bothnian Sea? — *Memoranda Societatis pro Fauna et Flora Fennica* 63: 91–96.
- Yang, G., Romero-Severson, J., Walton, M., Chadee, D. D. & Severson, D. W. 1999: Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: comparison of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers — *Molecular ecology* 8: 951–963.
- Zrzavy, J., Milhulka, S., Kepka, P., Bezdek, A. & Tietz, D. F. 1998: Phylogeny of the Metazoa based on morphological and 18S ribosomal DNA evidence — *Cladistics* 14: 249–85.
- Österblom, H., Hansson, S., Larsson, U., Hjerne, O., Wulff, F., Elmgren, R. & Folke, C. 2007: Human-induced trophic cascades and ecological regime shifts in the Baltic Sea — *Ecosystems* 10: 877–889.



Tiedekunta – Fakultet – Faculty Biotieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution– Department Biotieteiden laitos	
Tekijä – Författare – Author Sanja Maria Hakala			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Arktisen kampamaneetin esiintyminen ja populaatioiden välinen geneettinen vaihtelu Itämerellä			
Oppiaine – Läroämne – Subject Ekologia ja evoluutiobiologia			
Työn laji – Arbetets art – Level pro gradu		Aika – Datum – Month and year 3.10.2012	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 54
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Kampamaneetteja elää kaikissa mereisissä elinympäristöissä rannikoilta ulapalle ja merten syvänteisiin. Itämerellä on vanhastaan raportoitu elävän pikkumaneettia (<i>Pleurobrachia pileus</i>). Vuonna 2005 eteläiselle Itämerelle levisi pelätty tulokaslaji amerikankampamaneetti (<i>Mnemiopsis leidyi</i>), joka raportoitiin myös pohjoiselta Itämereltä vuonna 2007. Kuitenkin syksyllä 2008 määritettiin molekulaarisin menetelmin kolmas laji, arktinen kampamaneetti (<i>Mertensia ovum</i>). Tätä lajia ei ole aiemmin löydetty murtovedestä. Tässä opinnäytetyössä selvitin, mitä kampamaneettilajeja pohjoisella Itämerellä elää ja mitkä ovat niiden todelliset levinneisyysalueet Itämerellä. Lisäksi tutkin arktisen kampamaneetin populaatioiden geneettistä vaihtelua pohjoisen ja eteläisen Itämeren välillä AFLP-menetelmällä (Amplified Fragment Length Polymorphism).</p> <p>Aineistoni sisältää sulkumekanismilla varustetuilla keräysastiallisilla eläinplanktonhaaveilla kerätty näytesarjat pohjoiselta ja eteläiseltä Itämereltä. Saadut kampamaneettiyksilöt laskettiin ja mitattiin elävinä ja kuivatettiin DNA:n eristystä varten. Tein lajinmääritykset lajikohtaisten, 18S rRNA- ja ITS1-alueille suunniteltujen PCR-alukkeiden avulla. Kultakin näytteenotto pisteeltä kerättiin lisäksi tausta-aineistoa lämpötila-suolaisuusluotaimella. AFLP-näytepisteiksi valitsin kaksi pistettä pohjoiselta ja kaksi eteläiseltä Itämereltä. Kaikilta neljältä pisteeltä analysoin kymmenen yksilöä.</p> <p>Aineistoni mukaan amerikankampamaneettia ei esiinny pohjoisella Itämerellä, vaan sen levinneisyyden raja on Bornholmin altaan alueella. Arktinen kampamaneetti on koko Itämeren alueella yleinen ja paikoin hyvin runsaslukuinen. Yksilömäärät ovat suurimmillaan pohjoisella ja keskisellä Itämerellä, mikä viittaa siihen, että laji on paremmin sopeutunut pohjoisen Itämeren ympäristöoloihin. Laji esiintyy laikuttaisesti, mutta yksilömäärät ovat samansuuntaisia laajalla alueella, joten populaatio vaikuttaisi olevan vakaa. Tässä opinnäytetyössä havaitut arktisen kampamaneetin yksilömäärät vastaavat aiemmin Itämereltä raportoituja pikkumaneetin yksilömääriä. Myös vanhat kuvaukset Itämeren kampamaneettien elintavoista ja rakenteesta sopivat paremmin arktiseen kampamaneettiin kuin pikkumaneettiin. On todennäköistä, että Itämeren kampamaneetit ovat olleet arktista kampamaneettia jo viime vuosisadalla ja että laji on määritetty virheellisesti pikkumaneetiksi. Omassa aineistossani pikkumaneettia esiintyy harvalukuisena vain Pohjanmeren suulla.</p> <p>Arktisen kampamaneetin esiintymiseen eri vesikerroksissa vaikuttavat lämpötila ja suolaisuus. Itämeren arktiset kampamaneetit elävät pääasiassa syvimmissä vesikerroksissa lähellä pohjaa, missä vesi on suolaista ja viileää. Arktiset kampamaneetit ovat Itämerellä noin kymmenen kertaa Arktiksella eläviä yksilöitä pienempiä. Suomenlahden yksilöt ovat suurempia kuin eteläisen Itämeren.</p> <p>AFLP toimii kampamaneeteilla erinomaisesti, joskin DNA-näytteiden puhtauteen ja kontaminaation vähentämiseen on jatkotutkimuksessa syytä kiinnittää huomiota. Arktisen kampamaneetin yksilöiden välinen geneettinen vaihtelu on samassa suuruusluokassa kaikilla näytepisteilläni, ja samanlaista kuin merieläimillä yleensä. Pohjoisen Itämeren populaatio on geneettisesti hiukan tasaisempi ja eteläisellä Itämerellä yksilöiden välillä on enemmän vaihtelua. Etelän ja pohjoisen Itämeren yksilöt muodostavat omat, toisistaan eroavat populaationsa, mutta populaatioiden välillä on havaittavissa geenivirtaa. Eri populaatioiden väliset geneettiset erot ovat merieläimillä tyypillisesti pieniä, ja sama on havaittavissa myös Itämeren arktisella kampamaneetilla. Aineiston geneettisestä vaihtelusta noin 90 % oli näytepisteiden sisäistä 10 % näytepisteiden välistä. Tämä ero on pääosin etelän ja pohjoisen näytepisteiden välillä, sillä merialueiden sisäiset parittaiset erot olivat hyvin pieniä.</p> <p>Tämä opinnäytetyö yhdessä aiemman tutkimuksen kanssa osoittaa, että Itämerellä yleisin ja laajimmalle levinnyt kampamaneettilaji on arktinen kampamaneetti. Tätä ennen se on pohjoisella Itämerellä virheellisesti määritetty ensin pikkumaneetiksi ja myöhemmin amerikankampamaneetiksi. Tutkimukseni osoittaa, kuinka tärkeää luotettava lajinmääritys on kaikelle ekologiselle tutkimukselle.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Ctenophora, Mertensia ovum, lajintunnistus, AFLP, tulokaslajit, reliktilajit, hydrobiologia, populaatiogenetiikka			
Ohjaaja tai ohjaajat –Handledare – Supervisor or supervisors Maiju Lehtiniemi, Jaanika Blomster, Pia Mäenpää-Tahvanainen			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Helsingin yliopiston Viikin kampuskirjasto, Hb. opinnäytteet			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			